

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Bakalářská práce

**Příprava a enzymatická inkorporace deoxyribonukleosid  
trifosfátů odvozených od pyrimido[4,5-*b*]indolu do DNA  
pomocí vybraných polymeras**

Preparation and enzymatic incorporation of deoxyribonucleic triphosphates  
derived from pyrimido[4,5-*b*]indol to DNA using selected polymerases

**Bosáková Andrea**

Školitel: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha 2015

Tato práce byla vypracována na Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, Praha, 2014- 2015.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. a konzultantů prof. Michala Hocka, Ph.D., DSc. a Mgr. Pavly Perlíkové Ph.D. Všechny použité prameny byly řádně citovány.

.....

Místo a datum

.....

Podpis

## Poděkování

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za jeho ochotu a podporu, bez které by tato práce nevznikla. Poděkovat bych také chtěla prof. Michalu Hockovi, Ph.D., DSc. za možnost pracovat v jeho výzkumné skupině, za jeho čas a vstřícnost. Mé velké díky patří také Michalovi Tichému, který mě nejen seznámil s prostředím profesionální vědecké laboratoře, ale také mě uvedl do světa syntézy organických látek. Za cenné rady, nekonečnou trpělivost a vstřícný přístup bych ráda poděkovala Pavle Perlíkové. Další poděkování směřuji Jitce Daňové a Veronice Raindlové, které mi vytvořily příjemné pracovní prostředí a poskytly mi také mnoho rad a informací z oblasti biochemie. Za interpretaci NMR dat děkuji Radku Pohlovi a za změření hmotnostních spekter pak celému týmu hmotnostní spektrometrie ÚOCHB v.v.i.

Poděkovat bych chtěla také celé své rodině a to zejména své mamince, za její podporu a zájem. Velké díky patří také mému příteli Štěpánovi a mým kamarádům.

## **Abstrakt**

Tato bakalářská práce se zabývá syntézou pyrimido[4,5-*b*]indolových 2'-deoxynukleosidů a jejich následnou trifosforylací. Celkem byly připraveny tři nové analogy 2'-deoxyadenosin trifosfátu s anelovaným benzenovým jádrem.

Dále byla zkoumána schopnost vybraných DNA polymeras inkorporovat celkem čtyři modifikované 2'-deoxyribonukleotidy do oligonukleotidového řetězce pomocí tzv. primer extension (PEX) metody. Všechny modifikované 2'-deoxyribonukleotidy byly inkorporovány do oligonukleotidového řetězce, avšak úspěšnost následné elongace se lišila v závislosti na použité DNA polymerase a substituentu v poloze 6 ve struktuře substrátu.  
(In Czech)

## **Klíčová slova**

nukleosidy, modifikované nukleotidy, DNA polymerasy, PEX reakce

## **Abstract**

This bachelor thesis deals with the synthesis of pyrimido[4,5-*b*]indole 2'-deoxyribonucleosides and their following trifosforylation. Overall there three new analogues 2'-deoxyadenosine triphosphate with benzen ring were prepared.

Furthermore, the ability of DNA polymerase to incorporate in total four modified 2'-deoxyribonucleosides into the oligonucleotide strand by primer extension (PEX) method was observed. All the modified 2'-deoxyribonucleotides were incorporated into the oligonucleotide strand, however the success of the subsequent elongation was different accoring to the DNA polymerase that was used and according to the substitution in position 6 in the structure of substrate.

## **Key words**

nucleosides, modified nucleotides, DNA polymerase, PEX reaction

## Seznam zkratek

A-T páry	Nukleotidové páry, ve kterých je adenin spojen s thyminem
AcCl	Acetylchlorid
C-G páry	Nukleotidové páry, ve kterých je cytosin spojen s guaninem
dA*TP	Modifikovaný 2'-deoxyadenosin trifosfát
dATP	2'-deoxyadenosin trifosfát
DCM	Dichlormethan
DMF	N,N-dimethylformamid
DMT	4,4'-dimethyloxytrityl
dN*TP	Modifikovaný 2'-deoxynukleosid trifosfát
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Přírozený 2'-deoxynukleosid trifosfát
dRib	2-deoxyribosa
dsDNA	Dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
Et <sub>2</sub> O	Diethylether
Et <sub>3</sub> N	Triethylamin
EtOAc	Ethyl-acetát
FAM	Fluorescein amidit
HCV	Virus hepapitidy C
HPFC	Vysokoúčinná FLASH chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IC <sub>50</sub>	Koncentrace látky, při které uhynie 50 % testovaných organismů
KOD XL DNA polymerasa	Rekombinantní KOD 1 DNA polymerasa izolovaná z <i>Thermococcus kodakaraensis</i> a exprimovaná v <i>E. coli</i> (divoký typ, bez exonukleasové aktivity)
MALDI-TOF	Laserová ionizace za přítomnosti matrice s detektorem doby letu

MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
ON	Oligonukleotid
PWO DNA polymerasa	DNA polymerasa izolovaná z <i>Pyrococcus woesei</i>
Py	Pyridin
RE	Restrikční endonukleáza
RNA	Ribonukleová kyselina
RP-HPFC	Reverzní vysokoúčinná FLASH chromatografie
RT	Laboratorní teplota
SNP	Single nucleotide polymorphism (jednonukleotidový polymorfismus)
TDA-1	Tris [2-(methoxyethoxy)ethyl]amin
TEAB	Hydrogenuhličitan triethylamonný
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylen-1,2-diamin
TLC	Tenkvrstevná chromatografie
Tol	Toluol
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultrafialové záření
Vent (exo-) DNA polymerasa	Rekombinantní DNA polymerasa izolovaná z DNA polymeráza izolována z <i>Thermococcus</i> <i>litoralis</i> a exprimována v <i>E. coli</i>
X-Phos	2-dicyklohexylfosfino-2',4',6'-triisopropylbifenyl



# Obsah

<b>1. Teoretický úvod .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Deoxyribonukleová kyselina .....</b>	<b>11</b>
1.1.1 Obecné vlastnosti a struktura DNA .....	11
1.1.2 Chemická syntéza funkční DNA.....	13
1.1.3 Enzymatická syntéza funkční DNA.....	14
1.1.3.1 Primer extension (PEX).....	15
1.1.3.2. Polymerázová řetězcová reakce.....	16
1.1.4 DNA polymerasy a jejich využití.....	17
<b>1.2 Modifikované nukleotidy.....</b>	<b>19</b>
1.2.1 Syntéza modifikovaných nukleotidů.....	19
1.2.2 Aplikace modifikovaných nukleotidů.....	20
1.2.2.1 Bioanalytické aplikace.....	20
1.2.2.2 Aplikace v chemické biologii.....	21
1.2.3 Analogy 7-deazapurinových ribonukleosidů s anelovaným benzenovým kruhem .....	22
<b>2. Cíle práce.....</b>	<b>25</b>
<b>3. Experimentální část .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Materiál.....</b>	<b>26</b>
3.1.1 Chemikálie .....	26
3.1.2 Přístroje .....	28
<b>3.2 Syntéza cílových sloučenin.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3 Inkorporace syntetizovaných látek do DNA .....</b>	<b>39</b>
3.3.1 Inkorporace 2'-deoxyribonukleosid trifosfátu do DNA pomocí metody PEX.....	39
3.3.2 Příprava vzorků modifikovaných ON pro MALDI-TOF analýzu .....	40
<b>4. Výsledky a diskuze .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1 Syntéza cílových sloučenin.....</b>	<b>42</b>

4.1.1	Syntéza cukerné složky 2'-deoxyribonukleosidu .....	42
4.1.2	Syntéza nukleobáze 6.....	43
4.1.3	Syntéza pyrimido[4,5- <i>b</i> ]indolového 2'-deoxyribonukleosidu .....	43
4.1.4	Syntéza 6-hetarylpyrimido[4,5- <i>b</i> ]indolových 2'-deoxyribonukleosidů .....	45
4.1.5	Trifosforylace substituovaných pyrimido[4,5- <i>b</i> ]indolových 2'-deoxyribonukleosidů .....	46
<b>4.2</b>	<b>Inkorporace modifikovaných 2'-deoxyribonukleotidů do DNA .....</b>	<b>48</b>
<b>5.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>60</b>
	Citace .....	62

# 1. Teoretický úvod

## 1.1 Deoxyribonukleová kyselina

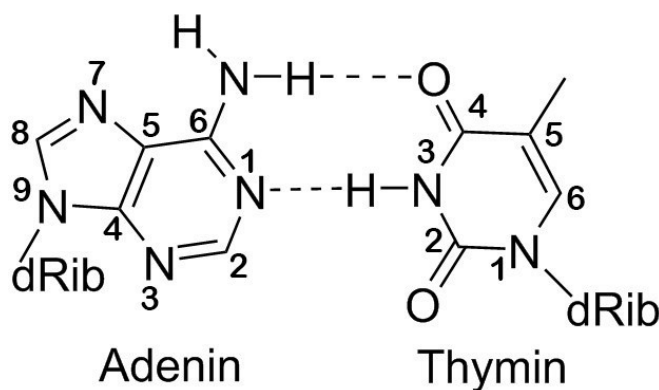
### 1.1.1 Obecné vlastnosti a struktura DNA

Díky své jedinečné schopnosti přenášet genetickou informaci patří molekula DNA mezi nejdůležitější a zároveň nejrozšířenější molekuly na Zemi. Struktura DNA byla poprvé popsána Watsonem a Crickem, kteří objasnili její dvoušroubovicovou helixovou podobu. Dva řetězce jsou v této struktuře stočeny kolem jedné osy.[1]

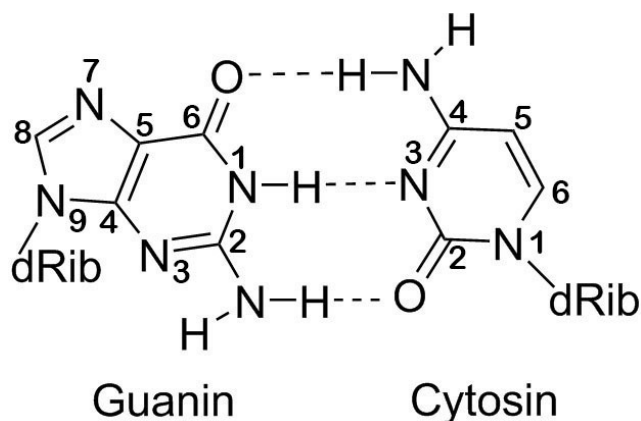
Zatímco v prokaryotních organismech se tato unikátní molekula vyskytuje volně v cytoplasmě, u eukaryotních organismů je organizovaná v jádře buňky a to ve formě chromatinu. Mimo jádro se DNA u eukaryot vyskytuje také v semiautonomních organelách, kterými jsou mitochondrie a plastidy.[2]

Jednotlivé řetězce jsou tvořeny 2-deoxy- $\beta$ -D-deoxyribofuranosou, která je spojena s nukleovou bází pomocí N-glykosidické vazby. Cukerná složka nese v pozici 5' zbytek kyseliny fosforečné. Tento fosfátový zbytek je záporně nabitý, a proto je pro molekulu DNA zásadní přítomnost kationtů, které obklopují negativně nabitou část DNA.

Soudržnost obou komplementárních vláken zajišťují báze, které jsou spojeny pomocí vodíkových vazeb. K vazbě dochází mezi purinovou a pyrimidinovou bází, přičemž adenin je komplementární k thyminu (obr. 1) a cytosin ke guaninu (obr. 2, str. 12). Báze se v polynukleotidovém řetězci vyskytují ve své keto tautomerní formě, která je oproti enol formě stálější.[1]



Obr. 1. Vodíkové vazby mezi adeninem a thyminem



Obr. 2. Vodíkové vazby mezi guaninem a cytosinem

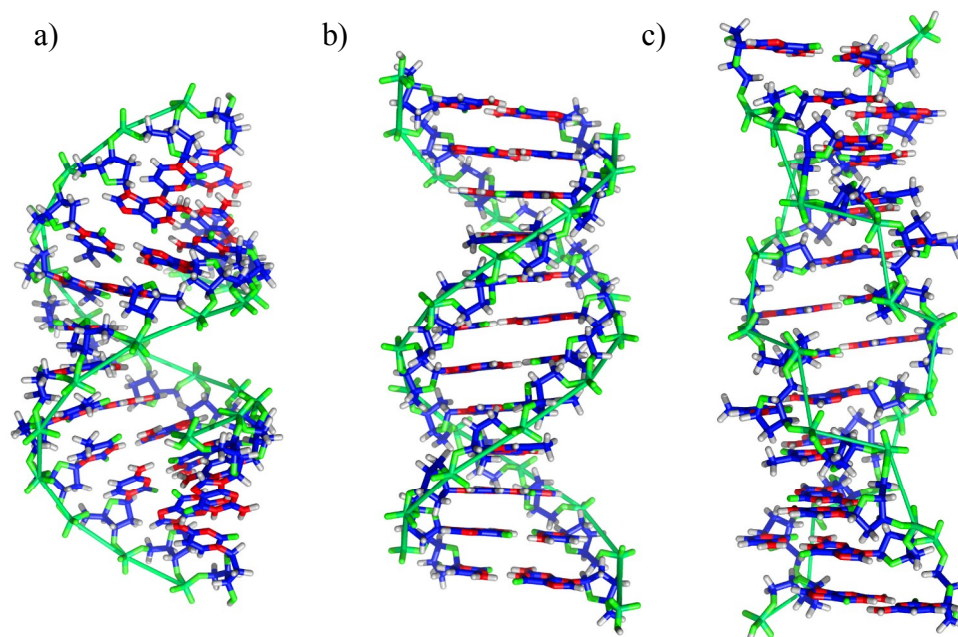
Zatímco primární struktura DNA je dána sekvencí jednotlivých aminokyselin, existují různé formy struktury sekundární, ve kterých se DNA vyskytuje (obr. 3, str. 13).

A-DNA představuje plochou a širokou formu DNA, ve které jsou báze nakloněny ostře k ose helixu. V této formě rozlišujeme pouze velký žlábek. Malý žlábek je natolik mělký, že jej ve své podstatě za žlábek ani nelze považovat.[3]

Nejrozšířenější formu představuje B-DNA, která je užší a více prodloužená. Báze jsou v této struktuře orientovány kolmo k ose helixu. Na rozdíl od A-DNA se v této formě vyskytuje jak velký, tak malý žlábek.[3]

Obě výše zmíněné formy představují typickou pravotočivou dvoušroubovicovou strukturu DNA. Za určitých podmínek lze dosáhnout konformačních změn, které vedou k přechodu jedné formy do druhé. Pokud například dojde k poklesu relativní vlhkosti na 75 %, pak běžně se vyskytující B-DNA reverzibilně přechází na A-DNA. Důležitou funkci v obou strukturách představuje také množství solí. Například 10% obsah solí stabilizuje B-DNA natolik, že ani vysoký pokles relativní vlhkosti nezpůsobí konformační změny vedoucí ke vzniku A-DNA.[3]

Vysokou koncentrací solí je také stabilizovaná tzv. Z-DNA, která se odvozuje od B-formy DNA. Z-DNA představuje levotočivou formu dvoušroubovice, jejíž struktura byla objasněna až po 25 letech od objevení B-DNA. Zkoumaný je zejména přechod B-formy DNA do Z-DNA, tento přechod je doprovázen reverzibilní konverzí specifických segmentů B-DNA a za určitých podmínek tak představuje důležitou roli v regulaci genové exprese.[4]



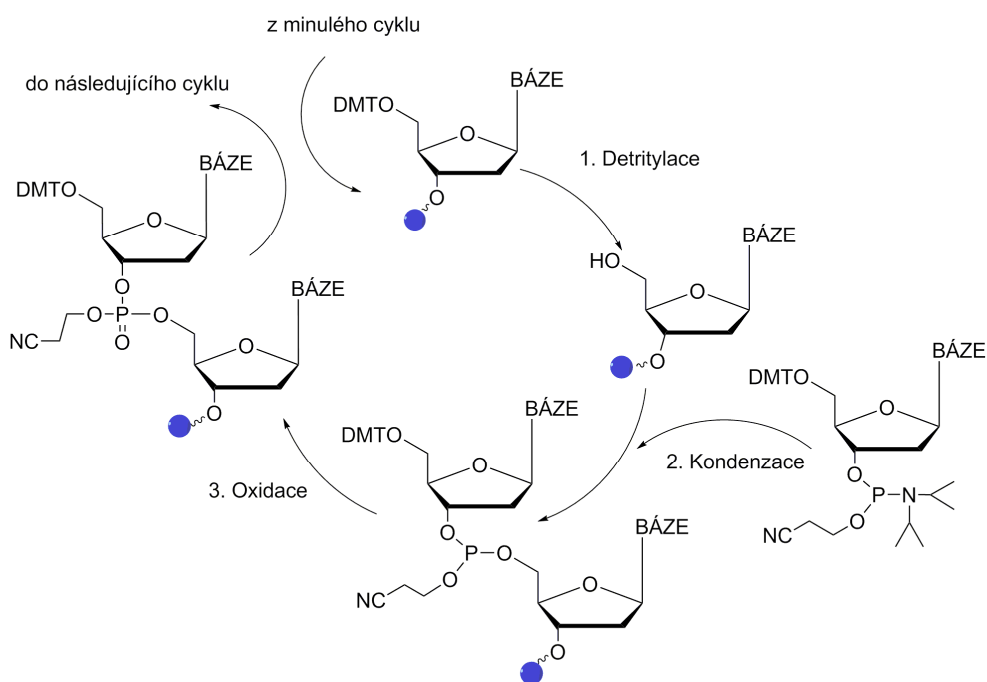
Obr. 3. Různé formy DNA: a) A-DNA, b) B-DNA, c) Z-DNA; převzato a upraveno z [5]

### 1.1.2 Chemická syntéza funkční DNA

Chemická syntéza DNA představuje rychlou a relativně nenáročnou cestu v přípravě oligonukleotidů. Existuje několik různých metod syntézy (fosfotriesterová, fosfodiesterová aj.), nicméně metoda fosforamiditová se ukázala jako nejefektivnější. I tato metoda má však své nevýhody jako například omezené množství funkčních skupin, které mohou modifikovat nukleotidy. Běžná délka oligonukleotidového řetězce syntetizovaného touto cestou bývá menší než 100 nukleotidů.

Fosforamiditová metoda syntézy oligonukleotidů probíhá ve směru od 3' k 5' konci a využívá se přitom pevná fáze. Celý proces lze rozdělit do několika kroků, které dohromady tvoří cyklus, během kterého se uplatňují molekuly fosforamidu jako nukleotidové stavební bloky. Nejprve dochází k detritylaci 3' vázaného nosného nukleotidu z předchozího cyklu, čímž je hydroxylová skupina na 3' konci odchráněna a může reagovat s amiditem. Fosforamidit je připojen couplingovou reakcí, v této fázi dochází k tzv. kondenzaci. Jelikož žádná chemická reakce neprobíhá zcela kvantitativně, je důležitou fází celého cyklu tzv. capping, během kterého je k reakční směsi přidán acetanhydrid, jenž acetyluje zbylé volné hydroxyskupiny, a tím ukončuje syntézu oligonukleotidového řetězce a zabraňuje dalším reakcím hydroxylové skupiny na

nezreagovaném 5' konci. V další fázi dochází k oxidaci, kdy se z fosfitu s oxidačním číslem III stává fosfát s oxidačním číslem V. Tyto kroky se opakují, dokud nedostaneme řetězec správné délky a sekvence. Na konci celého procesu pak dochází k uvolnění řetězce z pevné fáze a následnému odstranění kyanoethylové chránicí skupiny (viz obr. 4).<sup>[6]</sup>



Obr. 4. Chemická syntéza funkční DNA

### 1.1.3 Enzymatická syntéza funkční DNA

Další z cest, jak připravit DNA, je její enzymatická syntéza pomocí DNA polymerasy, která využívá jednotlivé 2'-deoxyribonukleotidy (dNTP) jako substráty za vzniku nového oligonukleotidového řetězce. Tímto způsobem lze získat nejen běžně se vyskytující DNA, ale také DNA, která ve své struktuře nese určité modifikace.

K vhodným modifikacím dochází v pozici 5 u pyrimidinových nukleotidů a v pozici 7 u 7-deazapurinových nukleotidů. Tyto modifikace směřují do velkého žlábků dsDNA, a tudíž neovlivňují samotnou strukturu dvoušroubovice. Diskutovaná byla i pozice 8 u purinových nukleotidů, ale v této pozici docházelo ke sterickeému bránění a jím vynucené *syn*-konformaci nukleobáze vůči cukerné složce, a proto takto modifikovaný

nukleotid není vhodným substrátem pro DNA polymerázu. Lze uvažovat také modifikace na cukerné složky, avšak zde je množství vhodných substituentů značně omezené.[7]

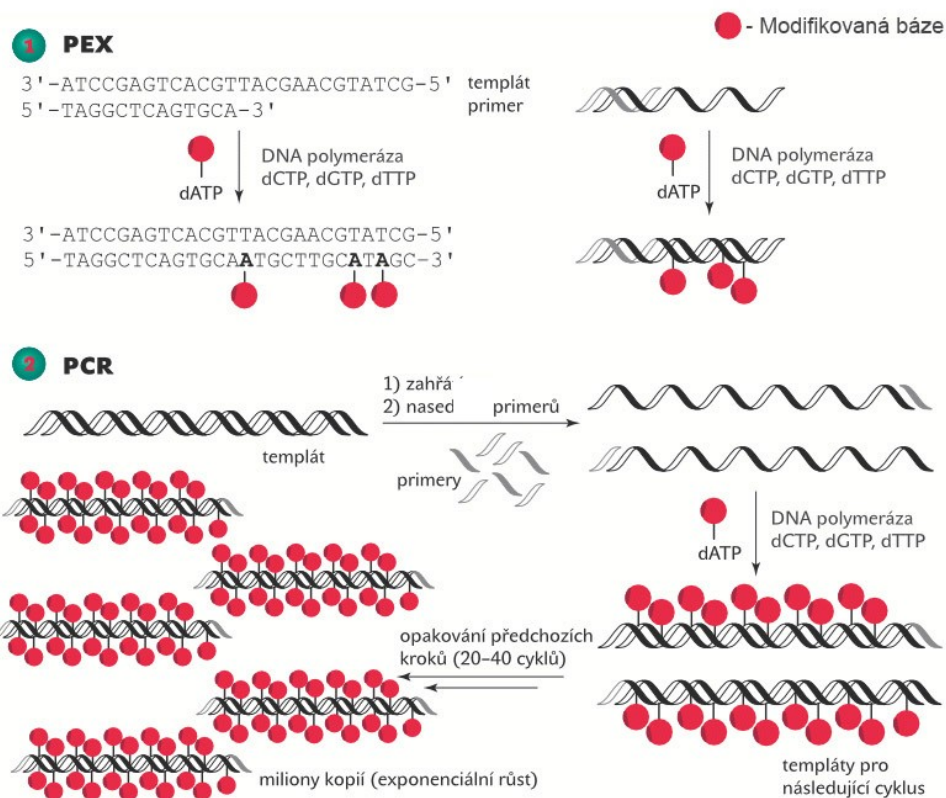
Základní a běžně používanou metodou pro inkorporaci dNTP, resp. pro jejich inkorporaci a následnou amplifikaci, je tzv. metoda primer extension (PEX) resp. polymerázová řetězová reakce (PCR).

#### 1.1.3.1 Primer extension (PEX)

Tato technika patří mezi nejjednodušší metody, kterými lze inkorporovat vhodně modifikované dNTP pomocí enzymů do oligonukleotidového řetězce. Využívají se přitom různé druhy DNA polymeras s termostabilními vlastnostmi (pracuje se při teplotách 50-70 °C). Běžnou vlastností přirozených DNA polymeras je jejich exonukleasová aktivita, avšak pro účely PEX je přítomnost této aktivity často nežádoucí, a proto o ni bývá enzym ochuzen (pracujeme s mutantama).

Samotný proces PEX vyžaduje kromě DNA polymerasy a dNTP přítomnost templátu a také primeru. Primery jsou často radioaktivně či fluorescenčně značeny na svém 5' konci pro snadnější detekci výsledného produktu. Jako templát slouží vlákno DNA, které je delší než primer a ke kterému jsou pak komplementárně přiřazovány dNTP pomocí DNA polymerasy (obr. 5, str. 16).

Pomocí gelové elektroforézy lze analyzovat PEX reakci a při použití pozitivních a negativních kontrol lze také prokázat, zda došlo k rozpoznání modifikovaného dNTP a následné inkorporaci. Při modifikacích ve vhodných polohách nukleotidů (viz výše) lze najít ve většině případech DNA polymerasu, která inkorporuje daný dN\*TP.[7]



Obr. 5. Princip inkorporace modifikovaného nukleotidu pomocí PEX a PCR; převzato a upraveno z [8]

### 1.1.3.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metoda PCR umožňující enzymatickou amplifikaci specifické sekvence nukleových kyselin byla objevena Karym Mullisem v 80. letech 20. století.[4] Princip metody spočívá nejprve v tepelné denaturaci templátové dsDNA, nasednutí primerů o dané sekvenci a nakonec v prodlužování samotného řetězce pomocí DNA polymerasy, která syntetizuje komplementární vlákno. Sled těchto reakcí je nazýván jako jeden cyklus (obr. 5).[4]

K amplifikaci DNA dochází nejčastěji v prostředí 10mM Tris pufru (pH mezi 8,5 až 9, při 25 °C), ve kterém jsou kromě templátu (pro modifikované dNTP ideálně 100-1000 bp) obsažené také 2'-deoxynukleosid trifosfáty (slouží k elongaci DNA, ale i jako zdroj energie), primery, DNA polymerasa a další látky jako např. různé soli a proteiny, které stabilizují ostatní komponenty reakce.



Během jednoho cyklu dochází k výrazným teplotním změnám, které odpovídají jednotlivým krokům amplifikace DNA (viz tabulka č. 1). K denaturaci DNA dochází při teplotě 94 °C, což je teplota, při které denaturuje drtivá většina enzymů, proto je důležité použít takovou DNA polymerasu, která odolá i vysokým teplotám. Běžně se používá např. Taq polymerasa, která se izoluje z bakterie *Thermus aquaticus*, jež se vyskytuje v horkých vřídlech.[9],[10]

Tabulka č. 1: Jednotlivé fáze cyklu při PCR

Fáze:	Teplota:	Doba:
Denaturace	94 °C	20-30 s
Nasedání primerů	55 °C	20-30 s
Prodlužování řetězce	72 °C	30-60 s

Specifita amplifikace závisí zejména na primerech, které se vážou na komplementární sekvenci teplátové DNA a tím umožňují Taq polymerase katalyzovat elongaci řetězce. Velikost primerů se pohybuje mezi 15-30 bázemi, které běžně obsahují asi 50-60 % guaninu a cytosinu. Vhodný primer by neměl mít žádnou sekundární strukturu a zároveň by neměl mít ve své struktuře palindromatickou sekvenci. Ideálně by také primery neměly obsahovat sekvence, které jsou navzájem komplementární (vznik dimerní formace primeru).[7], [8]

#### 1.1.4 DNA polymerasy a jejich využití

DNA polymerasy jsou nepostradatelné enzymy, které se podílejí na replikaci DNA buněk každého organismu. Tyto enzymy jsou schopné syntetizovat komplementární řetězce DNA podle určité předlohy (templátu), přitom využívají jednotlivé dNTP jako stavební bloky. Mimo replikace se DNA polymerasy podílejí také na opravách v DNA. [11]

Jako první byla objevena roku 1955 DNA polymerasa I (Pol I) v *E. coli*. [12] Tento objev vedl k objasnění mechanismu replikace a následných oprav, ale také otevřel prostor pro metody a techniky, které jsou na funkci DNA polymeras založeny (sekvenování, klonování, mutageneze, PCR, PEX ...). [11]

Zvláštním případem těchto enzymů jsou DNA polymerasy s termostabilními vlastnostmi, které mají zásadní význam pro řadu molekulárních aplikací. V dnešní době

existuje celá řada termostabilních DNA polymeras, které jsou izolovány z různých bakterií a archeí a podstupují různé úpravy.[13] Nejznámější DNA polymerasu s termostabilními vlastnostmi představuje Taq polymerasa, která byla poprvé izolována roku 1976 z bakterie *Thermus aquaticus*. [14] Nyní se tato DNA polymerasa získává ve své rekombinantní formě z *E. coli* a představuje důležitou složku při polymerázové řetězové reakci.

Dalším enzymem s termostabilními účinky je KOD polymerasa, která byla izolována z *Thermococcus kodakarensis*. [15] Její rekombinantní forma exprimovaná v *E. coli* má optimální aktivitu při pH 6,5 a teplotě 75 °C, často je však tento enzym využíván k elongaci, která probíhá při teplotě 68-72 °C. Typickou vlastností toho enzymu je jeho 3'→5' exonukleasová aktivita. Běžně využívaná je směs KOD1 a KOD<sup>(exo-)</sup>, zvaná KOD XL, která představuje spolehlivý nástroj k amplifikaci dlouhých řetězců (více než 15 kb) [16] a také k inkorporaci modifikovaných dNTP. [17]

Tli (Vent<sup>TM</sup>) DNA polymerasa byla izolována z *Thermococcus litoralis* [18] a v dnešní době se běžně využívají její nativní i rekombinované formy exprimované v *E. coli*, které mají téměř stejnou aktivitu. [19] Tato DNA polymerasa se často používá ve své mutantní formě (mutace v exonukleasové doméně), kdy postrádá 3'→5' exonukleasovou aktivitu, a tak nedochází k degradaci 3' terminálního konce primeru. Další výhodou této mutace je, že takovýto enzym není schopný oprav v podobě vyštěpování špatně zainkorporovaných dNTP, resp. dN\*TP. [19]

Jako poslední enzym s termostabilními vlastnostmi bych chtěla zmínit Pwo DNA polymerasu, která byla izolovaná z *Pyrococcus woesei* a její rekombinantní forma je exprimována v *E. coli*. [20] Tento enzym se vyznačuje 3'→5' exonukleasovou aktivitou, 5'→3' exonukleasová aktivita u tohoto enzymu nebyla detekována. [13]

Vedle výše zmíněných DNA polymeras existuje celá řada dalších enzymů s termostabilními vlastnostmi. Výše zmíněné DNA polymerasy byly popsány, jelikož se využívají pro inkorporaci modifikovaných dNTP. [21],[22] Proto byly právě tyto enzymy vybrány jako vhodné DNA polymerasy i pro experimentální účely této bakalářské práce.

## 1.2 Modifikované nukleotidy

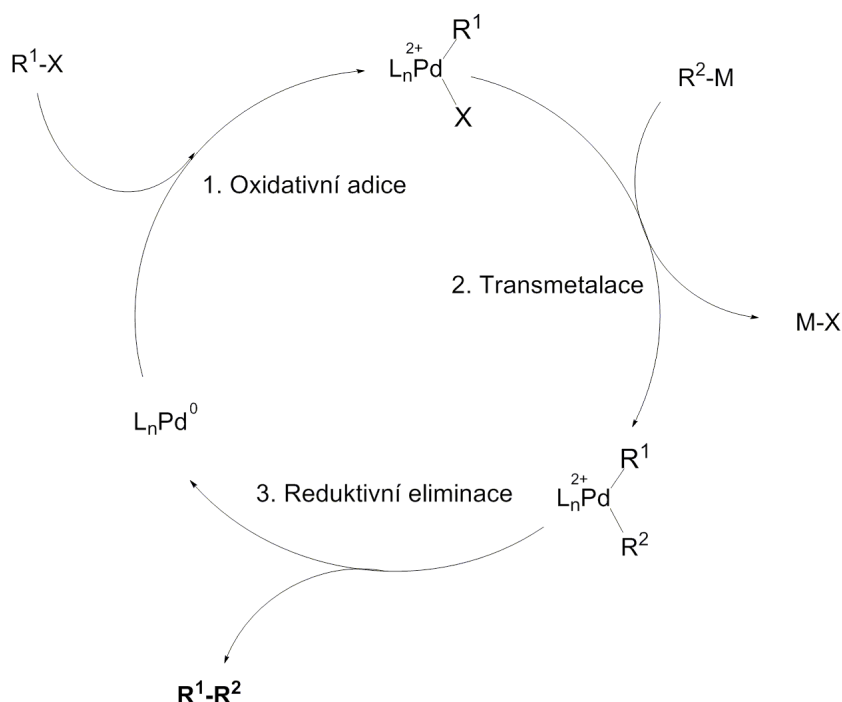
### 1.2.1 Syntéza modifikovaných nukleotidů

Existují dva principy, které vedou k syntéze nukleotidů s modifikovanou bází.

První princip vychází ze syntézy modifikovaných 2'-deoxyribonukleosidů, které jsou následně fosforylovány za vzniku 2'-deoxyribonukleosid trifosfátů. Tento postup však vyžaduje celou řadu reakčních kroků, což představuje relativně náročnou cestu k získání dN\*TP.[23]

Alternativní cestu představuje metoda vyvinutá v naší laboratoři, která vychází z fosforylace halogenovaného 2'-deoxyribonukleosidu, který je ve formě 2'-deoxyribonukleosid trifosfátu modifikován vhodným substrátem pomocí cross-couplingových reakcí.[24]

Cross-couplingové reakce představují jednu z možností, kterými lze získat nukleotid s modifikovanou bází. Ve své podstatě se jedná o reakci mezi organokovovou sloučeninou a organickým halogenidem (případně triflátem) za vzniku nové C-C vazby (obr. 6). Mezi nejrozšířenější patří Suzukiho cross-couplingová reakce a Stilleho cross-couplingová reakce, které využívají paladium jako katalyzátor.[25]



Obr. 6. Průběh cross couplingové reakce

## 1.2.2 Aplikace modifikovaných nukleotidů

Modifikací ve struktuře DNA se využívá v mnoha odvětvích jako například v diagnostice, biomedicinální chemii nebo bioanalytice.

### 1.2.2.1. Bioanalytické aplikace

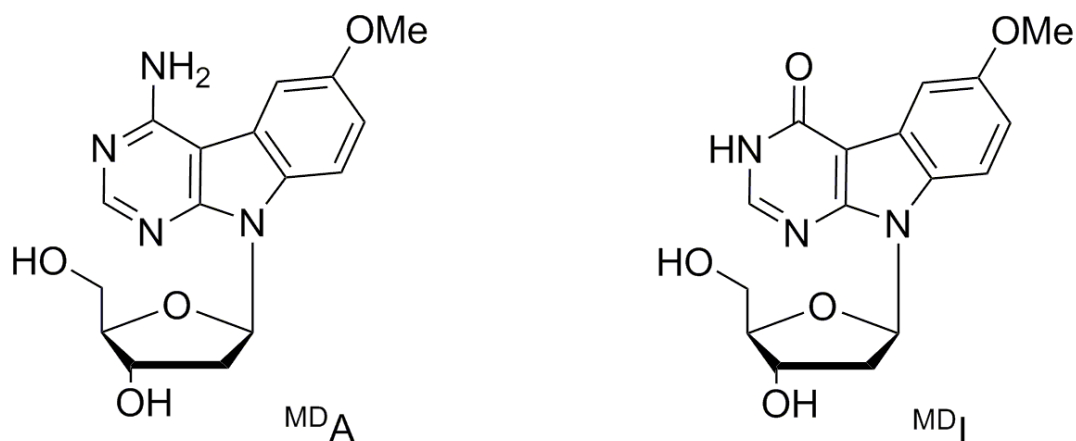
Tyto aplikace spočívají zejména ve vývoji redoxních značek s elektrochemickou detekcí, fluorescenčního značení či spinových značek.[7]

Fluorescenční značky mohou být konjugované přímo do vnitřní struktury DNA nebo mohou být kovalentně navázány na molekulu DNA. Takto navázané fluorescenční značky reagují na změnu svého okolí. Této změny je docíleno např. navázáním DNA vazebných proteinů na strukturu DNA. Po vazbě dojde ke změně polarity okolí fluorescenční značky, která vede ke změně intenzity fluorescenčního maxima. V této souvislosti byly vyvinuty např. solvatochromní aminoftalimidolové substituenty [26] nebo fluorofory inspirované zeleným fluorescenčním proteinem.[27]

Fluorescenční značky konjugované do struktury DNA mohou být analogy nukleotidů (pokud jsou vhodně modifikovány, probíhá jejich inkorporace podle Watson-Crickova principu) nebo to mohou být molekuly se zcela odlišnou strukturou. Analogy nukleotidů jsou schopny reagovat nejen na změnu hybridizace DNA, ale také na strukturální změny v DNA či na bodové změny nukleotidů v komplementárním řetězci DNA.[28] Bodové mutace mohou být příčinou mnoha onemocnění, kdy v dané sekvenci DNA dojde k záměně právě jednoho nukleotidu. Tento jev je označován jako jednonukleotidový polymorfismus (SNP; single nucleotide polymorphism) a k jeho zkoumání lze využít modifikovaných nukleotidů.

V této souvislosti byly syntetizovány nukleotidy s modifikovanou bází- (obr. 7, str. 21) methoxybenzodeazaadeninem (<sup>MD</sup>A) a methoxybenzodeazainosinem (<sup>MD</sup>I), které vykazují absorpční maxima při vlnových délkách atypických pro přírodní nukleotidy. Zároveň byly pozorovány změny intenzity fluorescence při vytvoření dsDNA obsahující výše zmíněné nukleosidy. V prvním případě došlo k vytvoření dsDNA s vlákny komplementárními- báze <sup>MD</sup>A komplementární k thyminu, resp. báze <sup>MD</sup>I komplementární k cytosinu, kdy se intenzita fluorescence výrazně snížila. Ve druhém případě se vytvořil tzv. „mismatched“ duplex (dsDNA obsahuje báze, které k sobě nejsou komplementární

podle Watson-Crickovy teorie), ve kterém došlo naopak ke zvýšení absorpance. Tyto poznatky mohou vést k rychlému a relativně levnému způsobu rozpoznání SNP.[29]



Obr. 7. Nukleosidy s modifikovanou bází podle Saita

Redoxně značené nukleotidy nesou ve své struktuře funkční skupiny schopné oxidace, resp. redukce. Každá skupina se přitom vyznačuje odlišným redoxním potenciálem, který je voltametricky detekovatelný. V naší skupině byla zkoumána značení dNTP např. pomocí ferrocenu [30], aminofenylu či nitrofenylu [31].

#### 1.2.2.2 Aplikace v chemické biologii

Chemická biologie představuje rychle se rozvíjející vědní obor, ve kterém mají modifikované nukleotidy nezastupitelné místo. Pomocí PCR či PEX je možné k oligonukleotidovému řetězci (ON) nebo DNA připojit další biomolekuly, čehož bylo využito pro syntézu konjugátů DNA s aminokyselinami [32], steroidy [33] i dalšími nukleobázemi [34]. Připojení postranních řetězců aminokyselin bylo studováno v souvislosti s katalytickou funkcí objevenou v sekundární struktuře, jenž se svými vlastnostmi podobá enzymům.[22], [23]

Obvykle dochází k vazbě na sacharidovou část nebo fosfátový zbytek oligonukleotidu a to jak na 3', tak na 5' konci. Biokojugace se však může uskutečnit i přes nukleobázi, přičemž se otevírá široké pole pro modifikace, kterými lze celý děj regulovat.[35]

Mezi nejvýznamější aplikace patří zavedení reaktivních funkčních skupin, které jsou schopny další biokonjugace s různými molekulami a biomolekulami. Studovanými substráty jsou např. alkyny [36], dieny [37] či aldehydy [38]. Publikovány byly také značky akrylamidové a vinylsulfoamidové, které se kovalentně vážou na cystein obsažený na rozpoznávacím místě proteinu a na DNA-vazebné místo ve struktuře proteinu p53.[35] Tento přístup lze dále aplikovat ve vývoji tzv. DNA sond („DNA pastiček“), které specificky vychytávají onkoproteiny a zároveň mohou sloužit např. k identifikaci neznámých DNA-vazebných proteinů.

Studován je také vliv substituentů různé velikosti na fungování restričních endonukleáz (RE), které štěpí DNA. Zatímco u cytosinu vede jakákoliv modifikace k ochraně před restričními endonukleázami, u uracilu (v poloze 5) a u 7-deazaadeninu (v poloze 7) jsou RE tolerovány pouze substituenty o menší velikosti.[39] Z toho faktu lze vyvodit, že páry C-G jsou pro sekvenčně specifické rozpoznávání důležitější než páry A-T.[7]

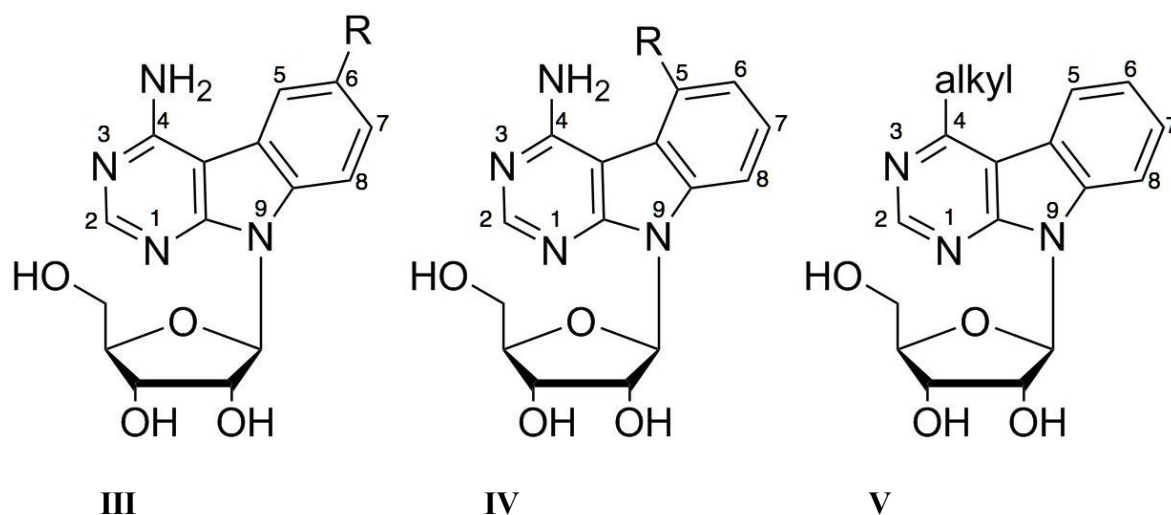
### **1.2.3 Analogy 7-deazapurinových ribonukleosidů s anelovaným benzenovým kruhem**

Již dříve byly publikovány analogy 7-deazapurin ribonukleosidů, konkrétně 7-hetaryl-7-deazaadenosiny [40] a 6-hetaryl-7-deazapurinové [41] ribnukleosidy nesoucí v pozici 7 jak vodík, tak fluor a v pozici 6 hetarylovou skupinu. Tyto látky vykazovaly nanomolární cytostatické účinky u rakovinných a leukemických buněčných linií. Vedle toho byla také objevena nespecifická antivirová aktivita a to zejména vůči HCV.

V naší laboratoři byly připraveny 5- a 6-substituované 4-amino či 4-alkylpyrimido[4,5-*b*]indolové ribonukleosidy, na kterých byla zkoumána jejich biologická aktivita.

Ribonukleosidy nesoucí (het)aryl v pozici 5 (**IV**) a 6 (**III**) byly připraveny pomocí Suzukiho, resp. Stilleho cross-couplingové reakce a to za účasti ligandu X-Phos (v případě ribonukleosidů odvozených od **IV** dochází však v přítomnosti tohoto ligandu pouze k malé konverzi, což je zapříčiněno stérickým bráněním, dobře ale funguje pro ribonukleosidy odvozené od **III**) a (het)arylboronové kyseliny, resp. het(aryl)tributylstannanu. Bylo také zjištěno, že Stilleho a Suzukiho cross-couplingové reakce fungují dobře v bezvodém

prostředí, zatímco ve vodném prostředí neposkytují vyšší výtěžky. Proto byly tyto reakce prováděny s nukleosidy a nikoliv s jejich trifosforylovanými analogy. Pyrimidoindolové ribonukleosidy modifikované v pozici 4 (**V**) byly také připraveny pomocí Pd-katalyzované cross-couplingové reakce nebo nukleofilní substituce, kterou podstupují odpovídající molekuly nesoucí v této poloze atom chloru.[42]



Obr. 8. Ribonukleosidy odvozené od pyrimido[4,5-*b*]indolu

V sérii 7-deazapurin ribonukleosidů s anelovaným benzenovým jádrem (obr. 8) byly použity nejen různé hetarylové skupiny jako substituenty v pozici 5 a 6 (viz tabulka č. 2).

Tabulka č. 2: Substituenty pro 7-deazapurinové ribonukleosidy

Substituenty pro <b>IV</b> :	Substituenty pro <b>III</b> :
-chlor <b>IVa</b>	-chlor <b>IIIa</b>
- 2-furyl <b>IVb</b>	-2-furyl <b>IIIb</b>
-butyl <b>IVc</b>	-3-furyl <b>IIIc</b>
-fenyl <b>IVd</b>	-fenyl <b>IIId</b>
-thienyl <b>IVe</b>	-2-thienyl <b>IIIe</b>
	-3-thienyl <b>IIIf</b>
	-2-benzofuryl <b>IIIg</b>

Výše zmíněné látky byly podrobeny zkoumání zaměřenému na jejich cytotoxické účinky ve vybraných buněčných kulturách. Kromě ribonukleosid **IIIg** nesoucí benzo-furyl v poloze 6 ( $IC_{50}$  proti nádorovým liniím 32-93  $\mu$ m), byly ostatní deriváty **III** a **IV** inaktivní. Dále byla zkoumána také antivirová aktivita, resp. účinek látek proti HCV a dengue viru. Vyšší aktivitu vykazoval 4-amino-5-chlornukleosid **IVa**, ta však byla doprovázena cytotoxickými projevy, naopak ribonukleosid **Va** nesoucí v pozici 4 methylovou skupinu nepůsobil většími cytostatickými účinky a jeho aktivita proti dengue viru dosahovala vysokých hodnot (v jednotkách  $\mu$ M).[42]

Kromě toho byly syntetizovány také pyrimido[4,5-*b*]indolové ribonukleosidy nesoucí fenylový (**VI**) či hetarylový (**VII**) substituent v pozici 4 a 4,6-disubstituované pyrimido[4,5-*b*]indolové ribonukleosidy (**VIII**). Tyto nukleosidy byly připraveny pomocí cross-couplingových reakcí za přítomnosti Pd jako katalyzátoru. Dále byly zkoumány jejich antivirové účinky (HCV, dengue virus), avšak žádná látka z této série nevykazovala signifikantní aktivitu.[43]

Důležité je, že všechny výše zmíněné látky mají fluorescenční vlastnosti a jsou tedy potencionálními nástroji k přípravě fluorescenčně značené RNA.[42] Analogy 7-deazapurinových 2-deoxyribonukleosidů odvozených od **III**, **IV** a **V** nebyly předtím připraveny. Syntézou některých derivátů **III** obsahujících místo ribosy 2-deoxyribosu se zabývá tato bakalářská práce.



## 2. Cíle práce

1. Syntéza 2'-deoxynukleotidů s modifikovanou bází odvozenou od pyrimido[4,5-*b*]indolu.
2. Inkorporace 2'-deoxyribonukleosid trifosfátů do DNA pomocí DNA polymeras: KOD XL, Vent (exo-) a Pwo.

## 3. Experimentální část

### 3.1 *Materiál*

#### 3.1.1 Chemikálie

(Benzofuran-2-yl)boronová kyselina, Frontier Scientific

(Furan-2-yl)tributylstannan, Sigma Aldrich

10x reakční pufr pro DNA polymerázu, Novagen (San Diego)

10x reakční pufr pro PWO DNA polymerázu, Peqlab

10x ThermoPol reakční pufr, New England Biolabs

2-deoxy-D-ribose, Sigma Aldrich

30% vodný roztok  $\text{NH}_3$ , Sigma Aldrich

Aceton, Penta

Acetylchlorid, Sigma Aldrich

Bezvodý MeOH, Sigma Aldrich

Bromfenolová modř, Sigma Aldrich

$\text{Bu}_3\text{N}$ , Sigma Aldrich

$\text{CHCl}_3$ , Sigma Aldrich

DEAE Sephadex, Sigma Aldrich

DMF, Sigma Aldrich

DOWEX 50WX8-100, Sigma Aldrich

$\text{Et}_2\text{O}$ , Sigma Aldrich

$\text{Et}_3\text{N}$ , Sigma Aldrich

$\text{EtOAc}$ , Penta

Formamid, Sigma Aldrich

Glycerol, Penta

HCl, Penta

HCl (g), Sigma Aldrich

Hexan, Penta

iPav (isopropanol:amoniak:voda; 11:7:2)

$\text{K}_2\text{CO}_3$ , Penta

KOD XL DNA polymerasa, Novagen (San Diego)  
KOH, Penta  
MeCN, Sigma Aldrich  
MeOH, Penta  
Pd(OAc)<sub>2</sub>, Sigma Aldrich  
Peroxošíran amonný, Sigma Aldrich  
POCl<sub>3</sub>, Sigma Aldrich  
Prim248, Sigma Aldrich  
dTTP, dATP, dGTP, dCTP, New England Biolabs  
Promývací pufr TEN 500 (10 mM TRIS, 1mM EDTA, 0,5M NaCl, pH=7,5)  
PWO DNA polymerasa, Peqlab  
Pyridin, Sigma Aldrich  
Sekvenační gel Rotiphorese, Roth  
Streptavidinové magnetické kuličky, Roche  
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin), Sigma Aldrich  
TEAB, připraven v laboratoři  
Temp<sup>OA</sup> (5' bio), Sigma Aldrich  
Temp<sup>OA</sup>, Sigma Aldrich  
Temp<sup>PB</sup> (5' bio), Sigma Aldrich  
Temp<sup>PB</sup>, Sigma Aldrich  
Toluen, Sigma Aldrich  
Toluoyl chlorid, Sigma Aldrich  
Trimethyl fosfát, Sigma Aldrich  
Vazebný pufr TEN 100 (10mM TRIS, 1mM EDTA, 0,1M NaCl, pH= 7,5)  
Vent(exo-) DNA polymerasa, New England Biolabs  
X-Phos, Sigma Aldrich  
Xylen Cyanol, Sigma Aldrich

### 3.1.2 Přístroje

Biotage SP-1 s kolonami FLASH 25+M, FLASH 40+M pro normální fázi ( $\text{SiO}_2$ ) nebo KP-C18-HS kolony pro reverzní HPFC, pro iontoměničovou separaci DEAE Sephadex (Sigma Aldrich)

Centrifuga: Eppendorf miniSpin

CentriVap vakuová odparka (Labconco)

DynaMagTM-2, Invitrogen

Elektroforéza: Sequigen Bio Rad, zdroj Bio Rad PowerPac

HPLC sestava Waters 2489 s dektektorem v VIS/UV oblasti Waters, s kolonou Luna 10 mikronů C18 (250x21.20 mm), Phenomenex

Nanodrop 1000 (ThermoScientific)

NMR spektrometr AscendTM 500 MHz Prodigy a UltraShieldTM 400 (Bruker)

NMR spektrometr AvanceTM 500 MHz (Bruker)

Termoblok: Eppendorf Thermomixer comfort

Typhoon FLA 9500, GE Healthcare

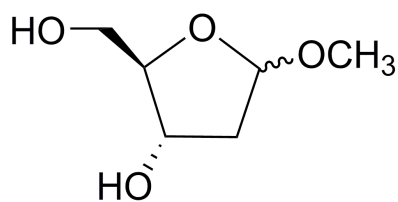
UltrafleXtremeTM MALDI-TOF/TOF hmotnostní spektrometr (Bruker Daltonics)

Vakuová odparka Büchi se zahřívací lázní B-480 a B-490

Vortex: Heidolph Reax control

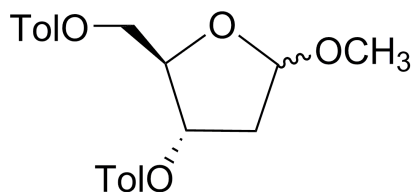
### 3.2 Syntéza cílových sloučenin

#### Methyl-2-deoxy-D-erythro-pentofuranosid (2)



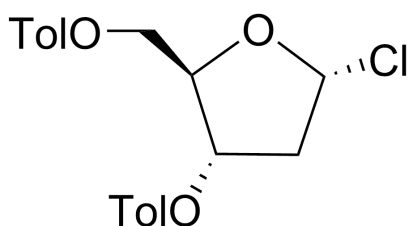
2-deoxy-D-ribose (**1**) (45 g; 0,34 mol) byla rozpuštěna v bezvodém methanolu (540 ml) a míchána za laboratorní teploty pod inertní argonovou atmosférou. Mezitím byl připraven roztok acetylchloridu (1,5 ml, 0,02 mol) v suchém methanolu (60 ml, 48 mol) o celkovém objemu 61,5 ml. Takto připravený roztok byl přidán k roztoku 2-deoxyribosy (**1**) a míchán za RT po dobu 1,5 h. Následně byl do reakční směsi přidán Py (15 ml; 0,19 mol), který byl poté z reakční směsi odpařen pomocí vakuové odparky. Dále byl ke směsi přidán toluen (2x150 ml) a znovu došlo k odpaření na vakuové odparce. Nakonec bylo přidáno ještě 50 ml toluenu. Reakce byla monitorována pomocí TLC. Po odpaření toluenu vznikl žluto-hnědý viskozní glykosid **2** (37,5 g; 75 %). NMR spektra jsou v souladu s literaturou.[44]

#### Methyl-3,5-di-O-(p-toluoyl)-2-deoxy-D-erythro-pentofuranosid (3)



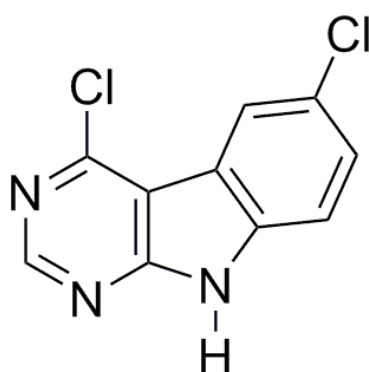
Glykosid **2** (37 g; 0,25 mol) byla za stálého míchání rozpuštěna v acetonu (420 ml). K roztoku byl následně přidán toluoyl chlorid (66 ml; 0,50 mol). Reakční směs byla chlazená ledem a pomalu k ní byl přidán Et<sub>3</sub>N (77 ml; 0,55 mol). Roztok byl míchán přes noc za RT. Dále byla reakční směs zfiltrována přes fritu. Filtrát byl zahuštěn (odpařeno na vakuové odparce) a následně k němu byl přidán MeOH (150 ml). Krystalizace při teplotě -18 °C však neproběhla úspěšně, proto byl MeOH odpařen a místo toho přidán aceton (70 ml), ve kterém se za zvýšené teploty směs rozpustila. Rozpuštěná směs byla naočkována standardem a opět vložena do teploty -18 °C. Další den byla reakce monitorována pomocí TLC, přičemž bylo zjištěno, že ochrání glykosidu opět neproběhla úplně. Vyloučené krystaly byly proto odsáty na fritě a filtrát byl odpařen. Po odpaření filtrátu jsem přidala ke směsi toluoyl chlorid (33 ml, 10,25 mol) a Py (150 ml; 1,85 mol), a směs byla míchána za RT přes noc, druhý den byla směs odpařena. Další zpracování proběhlo na chromatografické koloně (SiO<sub>2</sub>), (hexan/EtOAc, 0-10 % EtOAc). Průběh separace byl monitorován pomocí TLC. Frakce odpařeny a byl získán glykosid **3** (28 g; 29 %). Výsledky NMR spekter jsou v souladu s literaturou.[45]

### 3,5-di-*O*-(*p*-toluoyl)-2-deoxy- $\alpha$ -D-*erythro*-pentofuranosylchlorid (**4**)



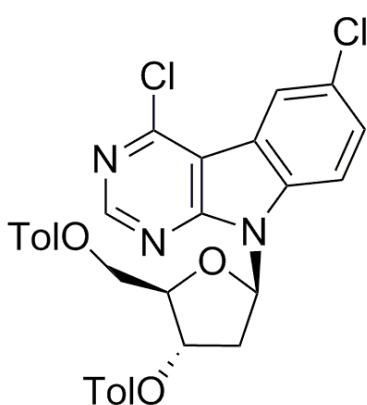
Výchozí látka **3** (28 g; 0,07 mol) byla rozpuštěna v Et<sub>2</sub>O/DCM (165 ml, 2,5:1). Při teplotě 0 °C byla reakční směs probublávána plynným HCl. Po ztuhnutí byla směs ponechána 30 minut při teplotě 0 °C a následně byl produkt odfiltrován přes fritu a promyt roztokem roztoku Et<sub>2</sub>O (2x 50 ml). Získané krystaly byly převedeny z frity a usušeny pod vakuem (3 h). Získána byla bílá pevná látka **4** (17,7 g; 65 %). Výsledky NMR spekter jsou v souladu s literaturou.[46]

### 4,6-dichlor-9*H*-pyrimido[4,5-*b*]indol (**6**)



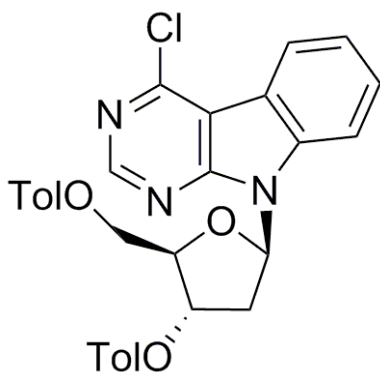
Látka **5** [43] (10,58 g, 0,05 mol) byla rozpuštěna v POCl<sub>3</sub> (50 ml; 0,54 mol) při teplotě 120 °C a reakce probíhala přes noc. Druhý den byl POCl<sub>3</sub> odpařen za sníženého tlaku a odparek byl následně rozpuštěn ve směsi vody a ledu. Reakční směs byla neutralizována 30% vodným roztokem NH<sub>3</sub> až do pH~7, produkt byl poté odfiltrován a promyt destilovanou vodou, kyselinou chlorovodíkovou a opět destilovanou vodou. Po usušení pod sníženým tlakem byl získán hnědý prášek **6** (11,85 g; 91 %). Výsledky NMR spekter jsou v souladu s literaturou.[43]

**4,6-dichlor-9-(3,5-di-*O-p*-toluoyl-2-deoxy- $\beta$ -D-*erythro*-pentofuranosyl)pyrimido[4,5-*b*]indol (8)**



Namletý hydroxid draselný (0,42 g; 7,49 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém MeCN (15 ml) a k roztoku byl následně pomalu přidán TDA-1 (59  $\mu$ l; 0,19 mmol). Reakční směs byla míchána 15 minut za laboratorní teploty, poté byl přidán pyrimidoindol **6** (500 mg; 2,10 mmol). Po dalších 30 minutách byla přidána halogenóza **4** (1,22 g; 3,14 mmol). Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC, s mobilní fází hexan/EtOAc (3:1), reakční směs byla míchána dalších 24 hodin za laboratorní teploty. Reakční směs byla následně filtrována přes křemelinu a filtrační koláč byl promyt acetonem. Produkt obsažený ve filtrátu byl získán odpařením rozpouštědla na vakuové odparce. Hnědý gel byl poté dvakrát přečištěn na chromatografické koloně (SiO<sub>2</sub>) (0-15 % EtOAc v hexanu). Získán byl nukleosid **8** jako pevná nažloutlá látka (870 mg; 70 %). <sup>1</sup>H NMR (499.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2.449, 2.454 (2  $\times$  s, 2  $\times$  3H, CH<sub>3</sub>-Tol); 2.63 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 14.2$ ,  $J_{2'b,1'} = 6.2$ ,  $J_{2'b,3'} = 2.6$ , H-2'b); 3.52 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 14.2$ ,  $J_{2'a,1'} = 8.6$ ,  $J_{2'a,3'} = 7.4$ , H-2'a); 4.60 (ddd, 1H,  $J_{4',5'} = 3.9$ , 3.3,  $J_{4',3'} = 3.8$ , H-4'); 4.71 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12.1$ ,  $J_{5'b,4'} = 3.9$ , H-5'b); 4.88 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12.1$ ,  $J_{5'a,4'} = 3.3$ , H-5'a); 5.93 (dddd, 1H,  $J_{3',2'} = 7.4$ , 2.6,  $J_{3',4'} = 3.8$ ,  $J_{3',1'} = 0.4$ , H-3'); 6.99 (ddd, 1H,  $J_{1',2'} = 8.6$ , 6.2,  $J_{1',3'} = 0.4$ , H-1'); 7.17 (dd, 1H,  $J_{7,8} = 8.8$ ,  $J_{7,5} = 2.1$ , H-7); 7.25, 7.30 (2  $\times$  m, 2  $\times$  2H, H-*m*-Tol); 7.73 (dd, 1H,  $J_{8,7} = 8.8$ ,  $J_{8,5} = 0.6$ , H-8); 7.93, 8.00 (2  $\times$  m, 2  $\times$  2H, H-*o*-Tol); 8.33 (dd, 1H,  $J_{5,7} = 2.1$ ,  $J_{5,8} = 0.6$ , H-5); 8.75 (s, 1H, H-2). <sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 21.72, 21.76 (CH<sub>3</sub>-Tol); 35.50 (CH<sub>2</sub>-2'); 63.62 (CH<sub>2</sub>-5'); 74.27 (CH-3'); 81.94 (CH-4'); 83.69 (CH-1'); 112.06 (C-4a); 113.26 (CH-8); 120.23 (C-4b); 122.91 (CH-5); 126.44, 126.80 (C-*i*-Tol); 128.42 (C-6); 128.52 (CH-7); 129.26, 129.30 (CH-*m*-Tol); 129.67, 129.82 (CH-*o*-Tol); 136.13 (C-8a); 144.22, 144.52 (C-*p*-Tol); 153.17 (C-4); 154.04 (CH-2); 155.83 (C-9a); 166.13, 166.15 (CO-Tol). HRMS (ESI) pro C<sub>31</sub>H<sub>25</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub>[<sup>35</sup>Cl]<sub>2</sub>Na: [M+Na]<sup>+</sup> vypočteno 612.10635; nalezeno 612.10646.  $\square$  MS-ESI (m/z): 590 [M+H]<sup>+</sup>; 592 [M+2+H]<sup>+</sup>; 612 [M+Na]<sup>+</sup>; 614 [M+2+Na]<sup>+</sup>; 1201 [2M+Na]<sup>+</sup>; 1203 [2M+2+Na]<sup>+</sup>.

**4-chlor-9-(3,5-di-*O*-*p*-toluoyl-2-deoxy- $\beta$ -D-*erythro*-pentofuranosyl)pyrimido[4,5-*b*]indol (9)**



Namletý hydroxid draselný (0,42 g; 07,49 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém MeCN (15 ml) a k roztoku byl pomalu přidáván TDA-1 (59  $\mu$ l; 0,19 mmol). Směs byla míchána 15 minut za laboratorní teploty, poté byl přidán pyrimidoindol **7** (500 mg; 2,10 mmol). Po dalších 30 minutách byla přidána halogenóza **4** (1,22 g; 3,13 mmol). Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC, s mobilní fází hexan:EtOAc (3:1) a reakční směs byla míchána

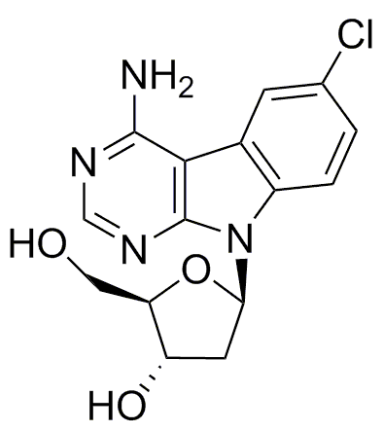
dalších 24 hodin za laboratorní teploty. Reakční směs byla následně filtrována přes křemelinu (viz výše). Produkt obsažený ve filtrátu byl získán odpařením rozpouštědla na vakuové odparce. Hnědý gel byl nakonec přečištěn na chromatografické koloně (SiO<sub>2</sub>) (0-15 % EtOAc v hexanu). Nukleosid **9** byl získán jako nažloutlá pevná látka (864 mg; 62 %). <sup>1</sup>H NMR (500.0 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2.44, 2.45 (2  $\times$  s, 2  $\times$  3H, CH<sub>3</sub>-Tol); 2.61 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 14.2$ ,  $J_{2'b,1'} = 6.2$ ,  $J_{2'b,3'} = 2.5$ , H-2'b); 3.58 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 14.2$ ,  $J_{2'a,1'} = 8.7$ ,  $J_{2'a,3'} = 7.5$ , H-2'a); 4.61 (dt, 1H,  $J_{4',5'} = 4.0$ , 3.4,  $J_{4',3'} = 3.4$ , H-4'); 4.73 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12.1$ ,  $J_{5'b,4'} = 4.0$ , H-5'b); 4.87 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12.1$ ,  $J_{5'a,4'} = 3.4$ , H-5'a); 5.95 (ddd, 1H,  $J_{3',2'} = 7.5$ , 2.5,  $J_{3',4'} = 3.4$ , H-3'); 7.05 (dd, 1H,  $J_{1',2'} = 8.7$ , 6.2, H-1'); 7.25 (m, 2H, H-*m*-Tol); 7.28 (ddd, 1H,  $J_{7,8} = 8.3$ ,  $J_{7,6} = 7.4$ ,  $J_{7,5} = 1.3$ , H-7); 7.30 (m, 2H, H-*m*-Tol); 7.40 (ddd, 1H,  $J_{6,5} = 7.7$ ,  $J_{6,7} = 7.4$ ,  $J_{6,8} = 1.0$ , H-6); 7.81 (dt, 1H,  $J_{8,7} = 8.3$ ,  $J_{8,5} = J_{8,6} = 1.0$ , H-8); 7.97, 8.01 (2  $\times$  m, 2  $\times$  2H, H-*o*-Tol); 8.39 (ddd, 1H,  $J_{5,6} = 7.7$ ,  $J_{5,7} = 1.3$ ,  $J_{5,8} = 1.0$ , H-5); 8.74 (s, 1H, H-2). <sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 21.74, 21.76 (CH<sub>3</sub>-Tol); 35.34 (CH<sub>2</sub>-2'); 63.82 (CH<sub>2</sub>-5'); 74.41 (CH-3'); 81.80 (CH-4'); 83.56 (CH-1'); 112.08 (CH-8); 112.83 (C-4a); 119.10 (C-4b); 122.67 (CH-6); 123.40 (CH-5); 126.53, 126.89 (C-*i*-Tol); 128.35 (CH-7); 129.21, 129.29 (CH-*m*-Tol); 129.73, 129.83 (CH-*o*-Tol); 137.83 (C-8a); 144.06, 144.45 (C-*p*-Tol); 152.74 (C-4); 153.52 (CH-2); 155.67 (C-9a); 166.14, 166.23 (CO). HRMS (ESI) pro C<sub>31</sub> H<sub>26</sub> O<sub>5</sub> N<sub>3</sub>[<sup>35</sup>Cl]Na: [M+Na]<sup>+</sup> vypočteno 578,14532; nalezeno 578,14547.  $\square$  MS-ESI (m/z): 556 [M+H]<sup>+</sup>; 578 [M+Na]<sup>+</sup>; 580 [M+2+Na]<sup>+</sup>; 1133 [2M+Na]<sup>+</sup>; 1135 [M+2+Na]<sup>+</sup>.



Nc1nc2c(ncn2[C@H]3[C@@H](O)[C@H](CO)[C@H]3O)c4ccccc41

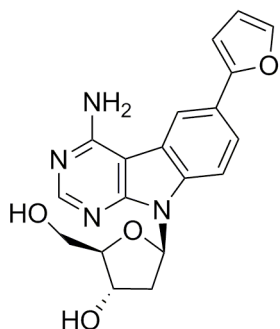
přečištěn pomocí HPFC (SiO<sub>2</sub>) (0-20 % MeOH v DCM). Získána byla bílá pevná látka **10** (86 mg; 43 %). <sup>1</sup>H NMR (600.1 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 2.06 (ddd, 1H, *J*<sub>gem</sub> = 13.1, *J*<sub>2'b,1'</sub> = 6.2, *J*<sub>2'b,3'</sub> = 2.4, H-2'b); 2.90 (ddd, 1H, *J*<sub>gem</sub> = 13.1, *J*<sub>2'a,1'</sub> = 9.0, *J*<sub>2'a,3'</sub> = 6.7, H-2'a); 3.64 (dd, 1H, *J*<sub>gem</sub> = 11.7, *J*<sub>5'b,4'</sub> = 4.2, H-5'b); 3.72 (dd, 1H, *J*<sub>gem</sub> = 11.7, *J*<sub>5'a,4'</sub> = 3.7, H-5'a); 3.88 (ddd, 1H, *J*<sub>4',5'</sub> = 4.2, 3.7, *J*<sub>4',3'</sub> = 3.0, H-4'); 4.48 (ddd, 1H, *J*<sub>3',2'</sub> = 6.7, 2.4, *J*<sub>3',4'</sub> = 3.0, H-3'); 5.29 (bs, 2H, OH-3',5'); 6.84 (dd, 1H, *J*<sub>1',2'</sub> = 9.0, 6.2, H-1'); 7.28 (ddd, 1H, *J*<sub>6,5</sub> = 8.0, *J*<sub>6,7</sub> = 7.3, *J*<sub>6,8</sub> = 1.0, H-6); 7.29 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>); 7.38 (ddd, 1H, *J*<sub>7,8</sub> = 8.3, *J*<sub>7,6</sub> = 7.2, *J*<sub>7,5</sub> = 1.2, H-7); 7.85 (ddd, 1H, *J*<sub>8,7</sub> = 8.3, *J*<sub>8,6</sub> = 1.0, *J*<sub>8,5</sub> = 0.7, H-8); 8.29 (s, 1H, H-2); 8.33 (ddd, 1H, *J*<sub>5,6</sub> = 7.8, *J*<sub>5,7</sub> = 1.2, *J*<sub>5,8</sub> = 0.7, H-5). <sup>13</sup>C NMR (150.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 37.66 (CH<sub>2</sub>-2'); 62.03 (CH<sub>2</sub>-5'); 71.02 (CH-3'); 82.98 (CH-1'); 87.24 (CH-4'); 95.74 (C-4a); 111.90 (CH-8); 120.34 (C-4b); 121.15 (CH-6); 121.48 (CH-5); 124.82 (CH-7); 135.70 (C-8a); 154.59 (CH-2); 154.88 (C-9a); 157.88 (C-4). HRMS (ESI) pro C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>N<sub>4</sub>Na: [M+Na]<sup>+</sup> vypočteno 323.1146; nalezeno 323.11152. MS-ESI (m/z): 301 [M+H]<sup>+</sup>; 323 [M+Na]<sup>+</sup>; 623 [2M+Na]<sup>+</sup>.

#### 4-amino-6-chlor-9-(2-deoxy- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl)pyrimido[4,5-b]indol (11)



Nukleosid **6** (677 mg; 1,15 mmol) byl zahřát na teplotu 120 °C v tlaku odolné skleněné nádobě spolu s dioxanem (7 ml) a 30% vodným roztokem amoniaku (21 ml). Reakce byla míchána při teplotě 120 °C do druhého dne. Následně byl monitorován průběh reakce pomocí TLC s mobilní fází CHCl<sub>3</sub>/MeOH (10:1) a reakce byla ponechána běžet za stálého míchání při teplotě 120 °C další 3 dny. Reakční směs byla poté odpařena za sníženého tlaku a produkt byl přečištěn pomocí HPFC (SiO<sub>2</sub>) (0-20 % MeOH v DCM). Získána byla bílá pevná látka **11** (270 mg; 70 %). <sup>1</sup>H NMR (600.1 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 2.06 (ddd, 1H, *J*<sub>gem</sub> = 13.1, *J*<sub>2'b,1'</sub> = 6.2, *J*<sub>2'b,3'</sub> = 2.4, H-2'b); 2.82 (ddd, 1H, *J*<sub>gem</sub> = 13.1, *J*<sub>2'a,1'</sub> = 8.9, *J*<sub>2'a,3'</sub> = 6.4, H-2'a); 3.63, 3.70 (2 × bddd, 2 × 1H, *J*<sub>gem</sub> = 12.0, *J*<sub>5',OH</sub> = 5.3, *J*<sub>5',4'</sub> = 4.0, H-5'); 3.87 (td, 1H, *J*<sub>4',5'</sub> = 4.0, *J*<sub>4',3'</sub> = 2.9, H-4'); 4.46 (m, 1H, H-3'); 5.21 (t, 1H, *J*<sub>OH,5'</sub> = 5.3, OH-5'); 5.31 (d, 1H, *J*<sub>OH,3'</sub> = 3.8, OH-3'); 6.82 (dd, 1H, *J*<sub>1',2'</sub> = 8.9, 6.2, H-1'); 7.38 (dd, 1H, *J*<sub>7,8</sub> = 8.8, *J*<sub>7,5</sub> = 2.1, H-7); 7.45 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>); 7.90 (d, 1H, *J*<sub>8,7</sub> = 8.8, H-8); 8.30 (s, 1H, H-2); 8.49 (d, 1H, *J*<sub>5,7</sub> = 2.1, H-5). <sup>13</sup>C NMR (150.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 37.77 (CH<sub>2</sub>-2'); 61.89 (CH<sub>2</sub>-5'); 70.91 (CH-3'); 83.01 (CH-1'); 87.29 (CH-4'); 95.07 (C-4a); 113.53 (CH-8); 120.82 (CH-5); 121.80 (C-4b); 124.55 (CH-7); 126.02 (C-6); 134.17 (C-8a); 155.31 (CH-2); 155.45 (C-9a); 157.93 (C-4). HRMS (ESI) pro C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>N<sub>4</sub>[<sup>35</sup>Cl]: [M+H]<sup>+</sup> vypočteno 335.09054, nalezeno 335.09061. MS-ESI (m/z): 335 [M+H]<sup>+</sup>; 357 [M+Na]<sup>+</sup>; 691 [2M+Na]<sup>+</sup>.

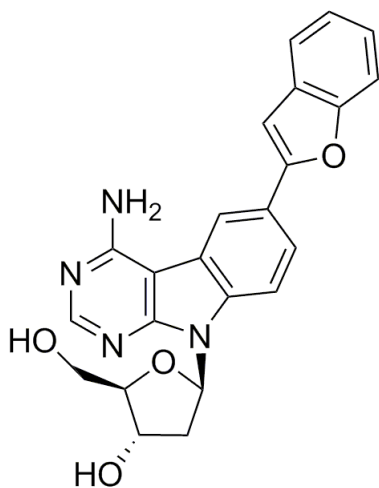
#### 4-amino-9-(2-deoxy- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl)-6-(furan-2-yl)pyrimido[4,5-b]indol (12)



Volný aminonukleosid **11** (120 mg; 0,36 mmol) byl rozpuštěn spolu s (furan-2-yl)SnBu<sub>3</sub> (192,9 mg; 0,54 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (4 mg; 0,20 μmol) a X-Phos (17 mg; 0,36 μmol) v bezvodém DMF (5 ml) při teplotě 120 °C. Za stálého míchání reakce probíhala dalších 24 hodin. Následně byl produkt přečištěn na RP-HPFC (10-100 % MeOH v H<sub>2</sub>O). Odpovídající frakce byly odpařeny na vakuové odparce a lyofilizovány (H<sub>2</sub>O). Cross-couplingovou reakcí byl získán bílý lyofilizát **12** (115 mg; 88 %). <sup>1</sup>H NMR (600.1 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 2.08 (ddd, 1H, *J*<sub>gem</sub> = 13.1, *J*<sub>2'b,1'</sub> = 6.2,

$J_{2'b,3'} = 2.4$ , H-2'b); 2.90 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 13.1$ ,  $J_{2'a,1'} = 8.9$ ,  $J_{2'a,3'} = 6.7$ , H-2'a); 3.65 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 11.9$ ,  $J_{5'b,\text{OH}} = 5.6$ ,  $J_{5'b,4'} = 4.3$ , H-5'b); 3.73 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 11.9$ ,  $J_{5'a,\text{OH}} = 4.4$ ,  $J_{5'a,4'} = 3.7$ , H-5'a); 3.88 (ddd, 1H,  $J_{4',5'} = 4.3$ , 3.7,  $J_{4',3'} = 3.0$ , H-4'); 4.48 (bm, 1H, H-3'); 5.26 (bdd, 1H,  $J_{\text{OH},5'} = 5.6$ , 4.4, OH-5'); 5.32 (bd, 1H,  $J_{\text{OH},3'} = 4.1$ , OH-3'); 6.62 (dd, 1H,  $J_{4,3} = 3.3$ ,  $J_{4,5} = 1.8$ , H-4-furyl); 6.83 (dd, 1H,  $J_{1',2'} = 8.9$ , 6.2, H-1'); 7.04 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 3.3$ ,  $J_{3,5} = 0.7$ , H-3-furyl); 7.44 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>); 7.73 (dd, 1H,  $J_{7,8} = 8.6$ ,  $J_{7,5} = 1.7$ , H-7); 7.74 (dd, 1H,  $J_{5,4} = 1.8$ ,  $J_{5,3} = 0.7$ , H-5-furyl); 7.90 (d, 1H,  $J_{8,7} = 8.6$ , H-8); 8.30 (s, 1H, H-2); 8.63 (d, 1H,  $J_{5,7} = 1.7$ , H-5). <sup>13</sup>C NMR (150.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 37.77 (CH<sub>2</sub>-2'); 62.00 (CH<sub>2</sub>-5'); 71.00 (CH-3'); 83.04 (CH-1'); 87.30 (CH-4'); 95.74 (C-4a); 104.95 (CH-3-furyl); 112.18 (CH-8); 112.25 (CH-4-furyl); 116.62 (CH-5); 120.53 (CH-7); 120.86 (C-4b); 124.33 (C-6); 135.10 (C-8a); 142.32 (CH-5-furyl); 154.14 (C-2-furyl); 154.92 (CH-2); 155.42 (C-9a); 157.94 (C-4). HRMS (ESI) pro C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub>: [M+H]<sup>+</sup> vypočteno 367.14008, nalezeno 367.14012. MS-ESI (m/z): 367 [M+H]<sup>+</sup>; 389 [M+Na]<sup>+</sup>; 755 [2M+Na]<sup>+</sup>.

#### 4-amino-6-(benzofuran-2-yl)-9-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)pyrimido[4,5-*b*]indol (13)



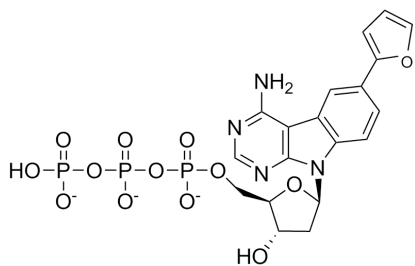
Volný aminonukleosid **11** (120 mg; 0,30 mmol) byl rozpuštěn spolu s (benzofuran-2-yl)boronovou kyselinou (116,3 mg; 0,60 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (4 mg; 0,181 μmol), X-Phos (17,1 mg; 0,30 μmol) a K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (148,9 mg; 0,90 mmol) v bezvodém DMF (5 ml) při teplotě 100 °C. Za stálého míchání reakce probíhala 24 hodin. Následně byl produkt přečištěn na RP-HPFC (10-100 % MeOH v H<sub>2</sub>O). Odpovídající frakce byly odpařeny na vakuové odparce a lyofilizovány (H<sub>2</sub>O). Získán byl bílý lyofilizát **13** (117 mg; 94 %). <sup>1</sup>H NMR (600.1 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 2.11 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 13.1$ ,  $J_{2'b,1'} = 6.2$ ,  $J_{2'b,3'} = 2.3$ , H-2'b); 2.92 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 13.1$ ,  $J_{2'a,1'} = 8.9$ ,  $J_{2'a,3'} = 6.7$ , H-2'a); 3.66 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 11.7$ ,  $J_{5'b,4'} = 4.1$ , H-5'b); 3.74 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 11.7$ ,  $J_{5'a,4'} = 3.6$ , H-5'a); 3.91 (ddd, 1H,  $J_{4',5'} = 4.1$ , 3.6,  $J_{4',3'} = 3.1$ , H-4'); 4.51 (ddd, 1H,  $J_{3',2'} = 6.7$ , 2.3,  $J_{3',4'} = 3.1$ , H-3'); 5.24-5.38 (bm, 2H, OH-3',5'); 6.86 (dd, 1H,  $J_{1',2'} = 8.9$ , 6.2, H-1'); 7.27 (ddd, 1H,  $J_{5,4} = 7.5$ ,  $J_{5,6} = 7.2$ ,  $J_{5,7} = 1.0$ , H-5-benzofuryl); 7.31 (ddd, 1H,  $J_{6,7} = 8.0$ ,  $J_{6,5} = 7.2$ ,  $J_{6,4} = 1.4$ , H-6-benzofuryl); 7.53 (d, 1H,  $J_{3,7} = 1.0$ , H-3-benzofuryl); 7.54 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>); 7.64 (dq, 1H,  $J_{7,6} = 8.0$ ,  $J_{7,3} =$

$J_{7,4} = J_{7,5} = 1.0$ , H-7-benzofuryl); 7.68 (ddd, 1H,  $J_{4,5} = 7.5$ ,  $J_{4,6} = 1.4$ ,  $J_{4,7} = 1.0$ , H-4-benzofuryl); 7.95 (dd, 1H,  $J_{7,8} = 8.6$ ,  $J_{7,5} = 1.6$ , H-7); 8.00 (d, 1H,  $J_{8,7} = 8.6$ , H-8); 8.33 (s, 1H, H-2); 8.88 (d, 1H,  $J_{5,7} = 1.6$ , H-5).  $^{13}\text{C}$  NMR (150.9 MHz, DMSO- $d_6$ ): 37.82 ( $\text{CH}_2\text{-}2'$ ); 61.99 ( $\text{CH}_2\text{-}5'$ ); 71.00 ( $\text{CH}\text{-}3'$ ); 83.12 ( $\text{CH}\text{-}1'$ ); 87.36 ( $\text{CH}\text{-}4'$ ); 95.70 (C-4a); 101.01 ( $\text{CH}\text{-}3\text{-benzofuryl}$ ); 111.13 ( $\text{CH}\text{-}7\text{-benzofuryl}$ ); 112.41 ( $\text{CH}\text{-}8$ ); 118.00 ( $\text{CH}\text{-}5$ ); 120.95 ( $\text{CH}\text{-}4\text{-benzofuryl}$ ); 120.99 (C-4b); 121.60 ( $\text{CH}\text{-}7$ ); 123.31 ( $\text{CH}\text{-}5\text{-benzofuryl}$ ); 123.39 (C-6); 124.20 ( $\text{CH}\text{-}6\text{-benzofuryl}$ ); 129.37 (C-3a-benzofuryl); 136.04 (C-8a); 154.32 (C-7a-benzofuryl); 155.10 ( $\text{CH}\text{-}2$ ); 155.60 (C-9a); 156.51 (C-2-benzofuryl); 157.99 (C-4). HRMS (ESI) pro  $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{N}_4$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočteno 417.15573; nalezeno 417.15569. MS-ESI (m/z): 417  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; 439  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; 855  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ .

### ***Obecná metoda syntézy 2'-deoxyribonukleosid trifosfátů odvozených od pyrimido[4,5-b]indolu***

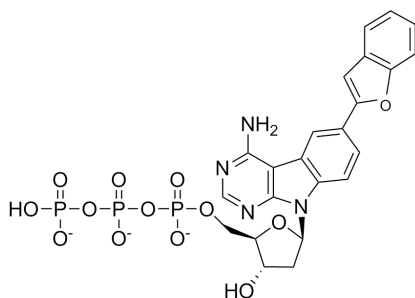
Nukleosid (50 mg) byl nejprve sušen po dobu 2 h při teplotě 80 °C pod vakuem a následně byl rozpuštěn v mikrovlnné vialce v trimethylfosfátu (0,7 ml) za současného chlazení ledem. Do mikrovlnné vialky bylo dále přidáno  $\text{POCl}_3$  (1,2 eq.) a za stálého míchání byla reakční směs ponechána 1,5 h. při teplotě 0 °C. Reakce byla monitorována pomocí TLC s mobilní fází  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (10:1). Následně byl do reakce přidán předem připravený roztok  $(\text{NHBU}_3)_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$  (5 eq.) a  $\text{Bu}_3\text{N}$  (4,2 eq.) v bezvodém DMF (0,8 ml). Po 2 h míchání při teplotě 0 °C byl k reakční směsi přidán 2M vodný TEAB (2 ml) a reakce tak byla ukončena. Následně byla rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku, přičemž produkt byl několikrát koevaporován s vodou. Nakonec byla provedena purifikace pomocí HPLC (5-100 % MeOH v 0,1M TEAB) nebo iontově výměnné chromatografie (DEAE Sephadex; 0-1,2M TEAB), možná kombinace obou. Nakonec byl 2'-deoxyribonukleosid trifosfát převeden z triethylamonné formy na sodnou sůl (vzorek rozpuštěn asi v 5 ml vody a nanesen na kolonu obsahující DOWEX 50WX8-100 v  $\text{Na}^+$  cyklu, promývání pomocí  $\text{H}_2\text{O}$ ). Mobilní fáze byla ze vzorku odpařena za nízkého tlaku a nukleotid byl nakonec lyofilizován ( $\text{H}_2\text{O}$ ).

**4-amino-9-(2-deoxy- $\beta$ -D-*erythro*-entofuranosyl)-6-(furan-2-yl)-pyrimido[4,5-*b*]indol-5'-O-trifosfát sodná sůl (14)**



Nukleosid **12** (50 mg; 0,14 mmol) byl fosforylován podle obecné metody. Produkt byl purifikován nejprve na DEAE Sephadexu, poté i na HPLC (viz obecná metoda). Získán byl lyofilizát **14** (29 mg; 39 %).  $^1\text{H}$  NMR (500.0 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ref(dioxane) = 3.75 ppm): 2.34 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 14.1$ ,  $J_{2'b,1'} = 6.4$ ,  $J_{2'b,3'} = 2.7$ , H-2'b); 2.97 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 14.1$ ,  $J_{2'a,1'} = 9.0$ ,  $J_{2'a,3'} = 7.7$ , H-2'a); 4.28 (qd, 1H,  $J_{4',5'} = J_{4',3'} = 3.6$ ,  $J_{\text{H,P}} = 1.6$ , H-4'); 4.33 – 4.46 (m, 2H, H-5'); 4.48 (ddd, 1H,  $J_{3',2'} = 7.7$ , 2.7,  $J_{3',4'} = 3.6$ , H-3'); 6.57 (dd, 1H,  $J_{4,3} = 3.3$ ,  $J_{4,5} = 1.8$ , H-4-furyl); 6.62-6.69 (m, 2H, H-1', H-3-furyl); 7.48 (bs, 1H, H-5); 7.51 (bd, 1H,  $J_{7,8} = 8.8$ , H-7); 7.58 (d, 1H,  $J_{5,4} = 1.8$ , H-5-furyl); 7.77 (d, 1H,  $J_{8,7} = 8.8$ , H-8); 7.97 (s, 1H, H-2).  $^{13}\text{C}$  NMR (125.7 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ref(dioxane) = 69.3 ppm): 39.81 ( $\text{CH}_2$ -2'); 68.06 (d,  $J_{\text{C,P}} = 4.8$ ,  $\text{CH}_2$ -5'); 73.23 (CH-3'); 85.78 (CH-1'); 87.25 (d,  $J_{\text{C,P}} = 8.8$ , CH-4'); 98.60 (C-4a); 107.40 (CH-3-furyl); 114.70 (CH-4-furyl); 116.00 (CH-8); 116.81 (CH-5); 122.64 (C-4b); 124.10 (CH-7); 127.17 (C-6); 136.39 (C-8a); 144.87 (CH-5-furyl); 154.32 (CH-2); 155.95 (C-2-furyl); 156.17 (C-9a); 157.76 (C-4).  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (202.3 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ): -22.32 (dd,  $J = 19.7$ , 17.0,  $\text{P}_{\square}$ ); -11.04 (d,  $J = 19.2$ ,  $\text{P}_{\square}$ ); -8.77 (d,  $J = 17.0$ ,  $\text{P}_{\square}$ ). HRMS (ESI) pro  $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_{13}\text{N}_4\text{NaP}_3$ :  $[\text{M}-\text{H}]^-$  vypočteno 605.02452; nalezeno 605.02452. MS-ESI (m/z): 525  $[\text{M}-\text{H}-\text{HPO}_3]^-$ ; 547  $[\text{M}-2\text{H}-\text{HPO}_3+\text{Na}]^+$ ; 605  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ; 627  $[\text{M}-2\text{H}+\text{Na}]^-$ ; 649  $[\text{M}-3\text{H}+2\text{Na}]^-$ .

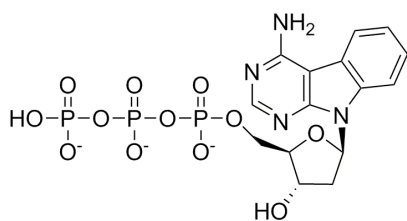
**4-amino-6-(benzofuran-2-yl)-9-(2-deoxy- $\beta$ -D-*erythro*-pentofuranosyl)pyrimido[4,5-*b*]indol-5'-O-trifosfát sodná sůl (15)**



Nukleosid **13** (50 mg; 0,12 mmol) byl fosforylován dle obecné metody. Produkt byl purifikován pomocí HPLC (viz obecná metoda). Získán byl lyofilizát **15** (39 mg; 55 %).  $^1\text{H}$  NMR (500.0 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ref(dioxane) = 3.75 ppm): 2.29 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 14.0$ ,  $J_{2'b,1'} = 6.7$ ,  $J_{2'b,3'} = 3.0$ , H-2'b); 2.95 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 14.0$ ,  $J_{2'a,1'} = 8.9$ ,  $J_{2'a,3'} = 7.7$ , H-2'a); 4.23 (qd, 1H,  $J_{4',3'} = J_{4',5'} = 3.9$ ,  $J_{\text{H,P}} = 1.0$ , H-4'); 4.35-4.44 (m, 2H, H-5'); 4.86 (ddd, 1H,  $J_{3',2'} = 7.7$ , 3.0,  $J_{3',4'} = 3.9$ , H-3'); 6.37 (dd, 1H,  $J_{1',2'} = 8.9$ , 6.7, H-1'); 6.44 (s, 1H,

H-3-benzofuryl); 7.05 (t, 1H,  $J_{5,4} = J_{5,6} = 7.2$ , H-5-benzofuryl); 7.09-7.16 (m, 2H, H-5, H-6-benzofuryl); 7.18 (d, 1H,  $J_{7,6} = 8.0$ , H-7-benzofuryl); 7.28 (d, 1H,  $J_{4,5} = 7.2$ , H-4-benzofuryl); 7.45 (d, 1H,  $J_{7,8} = 8.7$ , H-7); 7.51 (s, 1H, H-2); 7.64 (d, 1H,  $J_{8,7} = 8.7$ , H-8).  $^{13}\text{C}$  NMR (125.7 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ref(dioxane) = 69.30 ppm): 39.70 ( $\text{CH}_2\text{-2'}$ ); 68.13 (d,  $J_{\text{C,P}} = 5.7$ ,  $\text{CH}_2\text{-5'}$ ); 73.15 ( $\text{CH-3'}$ ); 85.38 ( $\text{CH-1'}$ ); 86.99 (d,  $J_{\text{C,P}} = 9.4$ ,  $\text{CH-4'}$ ); 98.47 (C-4a); 102.58 ( $\text{CH-3-benzofuryl}$ ); 113.16 ( $\text{CH-7-benzofuryl}$ ); 115.39 (CH-8); 118.20 (CH-5); 122.57 (C-4b); 123.25 ( $\text{CH-4-benzofuryl}$ ); 124.80 (CH-7); 125.44 ( $\text{CH-5-benzofuryl}$ ); 126.09 (C-6); 126.62 ( $\text{CH-6-benzofuryl}$ ); 131.32 (C-3a-benzofuryl); 137.01 (C-8a); 153.30 (CH-2); 155.65 (C-9a); 156.20 (C-7a-benzofuryl); 157.20 (C-4); 157.40 (C-2-benzofuryl).  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR (202.3 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ): -22.26 (t,  $J = 19.3$ ,  $\text{P}_\beta$ ); -10.97 (d,  $J = 19.3$ ,  $\text{P}_\alpha$ ); -8.90 (d,  $J = 19.3$ ,  $\text{P}_\gamma$ ). HRMS (ESI) pro  $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{O}_{13}\text{N}_4\text{NaP}_3$ :  $[\text{M-2H+Na}]^-$  vypočteno 677,02211; nalezeno 677,02136. MS-ESI ( $m/z$ ): 495  $[\text{M-H-H}_2\text{P}_2\text{O}_6]^-$ ; 575  $[\text{M-H-HPO}_3]^-$ ; 597  $[\text{M-2H-HPO}_3+\text{Na}]^+$ ; 655  $[\text{M-H}]^-$ ; 677  $[\text{M-2H+Na}]^-$ ; 699  $[\text{M-3H+2Na}]^-$ .

#### 4-amino-9-(2-deoxy- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl)pyrimido[4,5-*b*]indol-5'-O-trifosfát triethylamonná sůl (16)



Nukleosid **10** (50 mg; 0,13 mmol) byl fosforylován podle obecné metody. Produkt byl dvakrát přečištěn na HPLC (viz obecná metoda). Tentokrát nebyla látka převedena do sodného cyklu, ale byla rovnou lyofilizována. Byl získán lyofilizát **16** (28 mg; 44 %).  $^1\text{H}$  NMR (500.0 MHz,

$\text{CD}_3\text{OD}$ ): 1.30 (t, 18H,  $J_{\text{vic}} = 7.1$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$ ); 2.07 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 13.3$ ,  $J_{2'b,1'} = 6.2$ ,  $J_{2'b,3'} = 2.6$ , H-2'b); 2.75 (bm, 1H, H-2'a); 3.19 (q, 12H,  $J_{\text{vic}} = 7.1$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$ ); 4.16 (m, 1H, H-4'); 3.41 (ddd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 10.9$ ,  $J_{\text{H,P}} = 6.3$ ,  $J_{5'b,4'} = 4.5$ , H-5'b); 4.52 (bm, 1H, H-5'a); 4.71 (m, 1H, H-3'); 6.83 (dd, 1H,  $J_{1',2'} = 8.3$ , 6.2, H-1'); 7.22 (t, 1H,  $J_{6,5} = J_{6,7} = 7.3$ , H-6); 7.55 (dd, 1H,  $J_{7,8} = 8.2$ ,  $J_{7,6} = 7.3$ , H-7); 7.74 (bm, 1H, H-5); 8.02 (d, 1H,  $J_{8,7} = 8.2$ , H-8); 8.39 (bs, 1H, H-2).  $^{13}\text{C}$  NMR (125.7 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 9.12 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$ ); 38.90 ( $\text{CH}_2\text{-2'}$ ); 47.47 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$ ); 66.59 (d,  $J_{\text{C,P}} = 5.2$ ,  $\text{CH}_2\text{-5'}$ ); 72.04 (CH-3'); 84.57 (CH-1'); 86.98 (d,  $J_{\text{C,P}} = 9.2$ , CH-4'); 96.36 (C-4a); 115.20 (CH-8); 120.93 (C-4b); 121.56 (CH-5); 123.49 (CH-6); 127.80 (CH-7); 136.55 (C-8a); 150.22 (CH-2); 154.29 (C-9a); 159.84 (C-4).  $^{31}\text{P}$  NMR (202.3 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): -22.04 (b,  $\text{P}_\beta$ ); -9.50 (d,  $J = 21.0$ ,  $\text{P}_\alpha$ ); -8.56 (d,  $J = 20.4$ ,  $\text{P}_\gamma$ ). HRMS (ESI) pro  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_{12}\text{N}_4\text{P}_3$ :  $[\text{M-2H+Na}]^-$  vypočteno 594.95693; nalezeno 594.95686. MS-

ESI (m/z): 413 [M-H-H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>6</sub>]<sup>-</sup>; 415 [M+2-H-H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>6</sub>]<sup>-</sup>; 493 [M-H-HPO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>; 495 [M+2-H-HPO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>; 573 [M-H]<sup>-</sup>; 575 [M+2-H]<sup>-</sup>; 594 [M-2H+Na]<sup>-</sup>.

### 3.3 Inkorporace syntetizovaných látek do DNA

#### 3.3.1 Inkorporace 2'-deoxyribonukleosid trifosfátu do DNA pomocí metody PEX

Modifikované 2'-deoxyribonukleosid trifosfáty byly inkorporovány do oligonukleotidového řetězce pomocí tří DNA polymeras: KOD XL, Vent (exo-) a Pwo. Nejprve byl připraven reakční roztok obsahující fluorescenčně značený primer (prim248short s FAM na 5'), templát (temp<sup>OA</sup> nebo temp<sup>PB</sup>), DNA polymerasu, dNTP (dGTP pro temp<sup>OA</sup> a směs dGTP, dTTP, dCTP pro temp<sup>PB</sup>), reakční pufr pro enzym (dodaný výrobcem) a vodu. Následně byl k roztoku přidán modifikovaný dA\*TP, přirozený dATP (pro pozitivní kontrolu) či voda (pro kontrolu negativní). Takto připravené roztoky byly inkubovány při teplotě 60 °C, poté k nim byl přidán tzv. stop solution (20 µl, 80% [v/v] formamid, 20mM EDTA, 0,025% [w/v] bromfenolová modř, 0,025% [w/v] xylen kyanol) a celá směs byla zahřáta na teplotu 95 °C po dobu 5 min. Přesná množství komponent reakce a experimentální podmínky reakce jsou uvedeny níže.

Vzorky byly separovány pomocí 12,5% PAGE elektroforézy při denaturačních podmínkách. Polyakrylamidový gel byl připraven smícháním sekvenačního gelu Rotiphorese (30 ml), 2x koncentrovaného TBE pufru (TRIS 21,6 g; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 11,0 g; EDTA 1,5 g; H<sub>2</sub>O 1 l; 30 ml), TEMED (24µl) a peroxosíranu amonného (10% [w/v]; 180 µl). Po ukončení polymerace, která trvala asi 1 h, byl gel vyhříván na teplotu 55 °C (výkon 110 W). Následně byly do jamek v gelu naneseny vzorky (4 µl) a separace probíhala při denaturačních podmínkách (42 mA, 1 h.). Konečná vizualizace byla provedena pomocí fluorescence a přístroje Typhoon FLA 9500.

Během přípravy roztoků k PEX reakci byly optimalizovány podmínky, které se pro každý enzym a templát lišily. Tyto podmínky jsou uvedeny v tabulce 3 a 4 (str. 40). Každý roztok (20 µl) obsahoval mimo níže uvedených látek také fluorescenčně značený (FAM) primer (0,15µM) o sekvenci 3'-GGGTACGGCGGGTAC-FAM-5', temp<sup>OA</sup> (0,23µM) o sekvenci 5'-CCCTCCCATGCCGCCCCATG-3' nebo temp<sup>PB</sup> (0,23µM) o sekvenci 5'-CTAGCATGAGCTCAGTCCCATGCCGCCCCATG-3' a reakční pufr pro daný enzym.

Tabulka č. 3 Složení reakční směsi pro PEX s použitím temp<sup>OA</sup>

	KOD XL	Pwo	Vent (exo-)
Enzym	0,0625 U	0,2 U	0,1 U
dGTP	15μM	60μM	15μM
dA*TP	30μM	200μM	120μM
Doba trvání	15 min	20 min	30 min

Tabulka č. 4 Složení reakční směsi pro PEX s použitím temp<sup>PB</sup>

	KOD XL	Pwo	Vent (exo-)
Enzym	0,0625 U	0,4 U	0,1 U
dGTP, dTTP, dCTP	30μM	100μM	60μM
dA*TP	1200μM	200μM	200μM
Doba trvání	30 min	20 min	30 min

### 3.3.2 Příprava vzorků modifikovaných ON pro MALDI-TOF analýzu

Nejprve byla připravena reakační směs (50μl) pro PEX reakci, která obsahovala tentokrát neznačený primer (prim248short; 0,16μM), biotinylovaný templát (5'-bio-temp<sup>OA</sup> nebo 5'-bio-temp<sup>PB</sup>; 0,16μM), dNTP(s) (dGTP pro temp<sup>OA</sup> a směs dGTP, dTTP, dCTP pro temp<sup>PB</sup>; 22,5μM), KOD XL DNA polymerasu (0,1875 U), pufr pro tento enzym (dodaný výrobcem; 5μl) a vodu. K této směsi byly přidány dA\*TP (300 μM). Takto připravené roztoky byly inkubovány 40 min. při teplotě 60 °C.

Roztok se streptavidinovými magnetickými kuličkami (150 μl) byl promyt pomocí vazebného pufru TEN 100 (3 x 300 μl; 10mM TRIS, 1mM EDTA, 0,1M NaCl, pH= 7,5). Dále byl přidán PEX roztok (příprava viz výše) a vazebný pufr TEN 100 (100 μl).



Suspenze byla míchána (4500 rpm) 30 min při teplotě 15 °C. Magnetické kuličky byly poté přichyceny na magnet a promyty promývacím pufrém TEN 500 (3 x 400 µl; 10 mM TRIS, 1mM EDTA, 0,5M NaCl, pH=7,5) a vodou (4 x 400 µl). Následně byla přidána voda (50 µl) a vzorek byl denaturován po dobu 2 min při teplotě 55 °C (9000 rpm). Kuličky byly ve stojanu opět přichyceny k magnetu a roztok byl rychle (aby nedošlo k opětovné tvorbě dvoušroubovice) přenesen do čisté zkumavky. Produkt byl analyzován pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala Kateřině Novákové z týmu hmotnostní spektrometrie ÚOCHB v.v.i. za interpretaci dat z hmotnostní spektrometrie. Výsledky jsou popsány na str. 53-59.

## 4. Výsledky a diskuze

### 4.1 Syntéza cílových sloučenin

#### 4.1.1 Syntéza cukerné složky 2'-deoxyribonukleosidu

Příprava cukerného bloku vycházela z látky komerčně dostupné, 2-deoxy-D-ribosy (**1**), syntézu Hofferova cukru popisuje schéma 1. V prvním kroku byl připraven methylglykosid (**2**) reakcí láky **1** s acetylchloridem v bezvodém methanolu,[44] výtěžek této reakce činil 75 %. V následujícím kroku byly na hydroxylové skupiny v poloze 3' a 5' glykosidu **2** zavedeny *p*-toluoylové chránicí skupiny pomocí reakce s *p*-toluoylchloridem a Et<sub>3</sub>N v acetonu,[45] výtěžek reakce činil 29 %. Finálním krokem přípravy cukerné složky byla halogenace chráněného glykosidu **3**. Chlorace byla provedena mechanismem nukleofilní substituce, kdy byla reakční směs v roztoku Et<sub>2</sub>O/DCM probublávána plynným HCl.[46] Výtěžek této reakce činil 65 %.

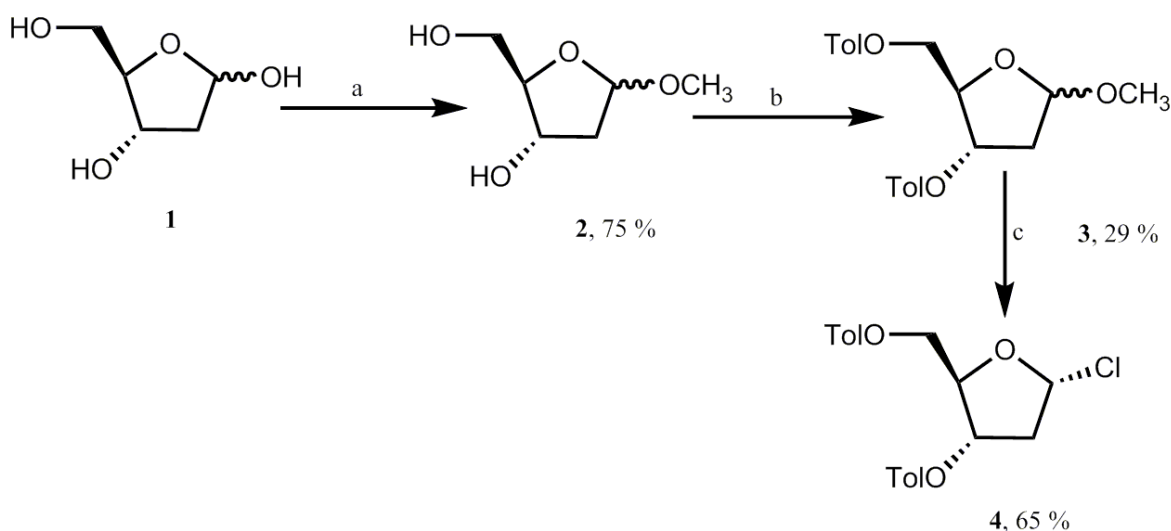


Schéma 1. Syntéza Hofferova chlorcukru **4**; **a)** AcCl, bezvodý MeOH, RT, 1,5 h; **b)** *p*-toluoylchlorid, Et<sub>3</sub>N, aceton, RT, 24 h; **c)** HCl<sub>(g)</sub>, Et<sub>2</sub>O/DCM, 0 °C

### 4.1.2 Syntéza nukleobáze 6

Syntéza báze **6** byla provedena chlorací výchozí látky **5** (báze byla připravena kolegou Michalem Tichým) pomocí  $\text{POCl}_3$  při teplotě  $120\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 24 h.[43] Následné bazické zpracování poskytlo nukleobázi **6** ve výtěžku 91 %. Reakce je popsána schématem 2.

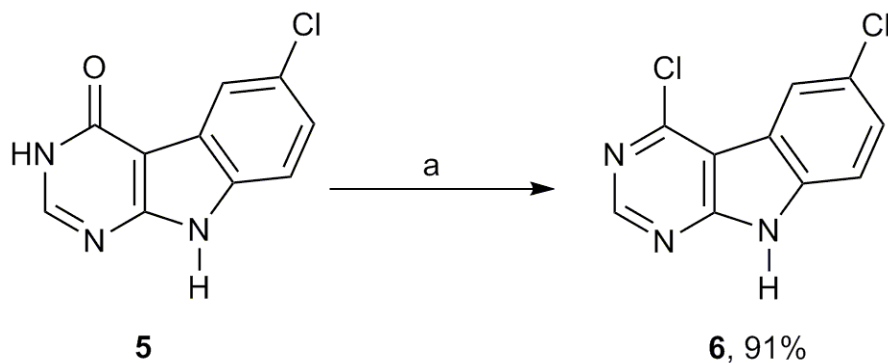


Schéma 2. Syntéza nukleobáze **6**; a)  $\text{POCl}_3$ ,  $120\text{ }^\circ\text{C}$ , 24 h.

### 4.1.3 Syntéza pyrimido[4,5-*b*]indolového 2'-deoxyribonukleosidu

Celkem byly provedeny dvě glykosylační reakce. V prvním kroku byl syntetizován chráněný pyrimido[4,5-*b*]indolový 2'-deoxyribonukleosid **8** se dvěma atomy chloru v pozici 4 a 6 a 2'-deoxyribonukleosid **9** s jedním atomem chloru v pozici 4. Nejprve byl vždy připraven roztok KOH, MeCN a TDA-1 (zvyšuje rozpustnost KOH v rozpouštědle), ke kterému byla přidána báze **6** či **7** (báze připravena kolegou Michalem Tichým). Následně byla k reakční směsi přidána halogenóza **4**, která reagovala s nukleobází **6**, resp. **7** mechanismem bimolekulární substituce [43] za vzniku nukleosidu **8** ve výtěžku 70 %, resp. nukleosidu **9** ve výtěžku 62 %. Reakci vystihuje schéma č. 3 (str. 44).

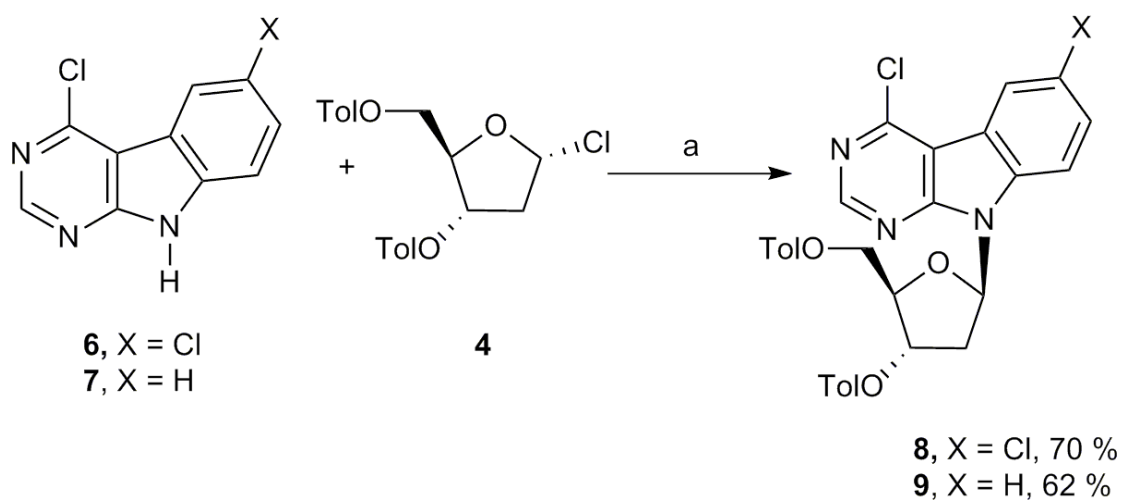


Schéma 3. Syntéza pyrimido[4,5-*b*]indolového 2'-deoxyribonukleosidu s chráněným cukrem; **a**) KOH, MeCN, TDA-1, RT, 24 h.

Aminace a odchránění cukerné složky bylo provedeno v roztoku dioxanu a 30% vodného amoniaku za vzniku látky **10** ve výtěžku 43 % a látky **11** ve výtěžku 70 %. Reakce je znázorněna ve schématu č. 4.

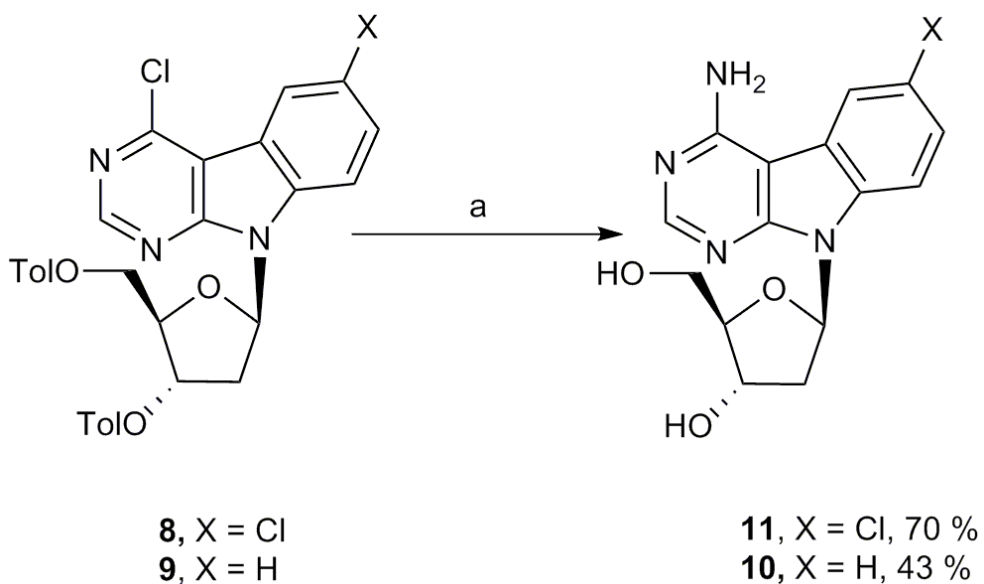


Schéma 4. Syntéza volných pyrimido[4,5-*b*]indolových 2-deoxyribonukleosidů; **a**) vodný roztok NH<sub>3</sub> a dioxanu (3:1), 100 °C, 24 h.

#### 4.1.4 Syntéza 6-hetarylpyrimido[4,5-*b*]indolových 2'-deoxyribonukleosidů

Výchozí látkou pro syntézu substituovaných 2'-deoxyribonukleosidů **12** a **13** byl 4-amino-6-chlor-9-(2-deoxy-β-D-ribofuranosyl)pyrimido[4,5-*b*]indol (**10**).

V případě syntézy látky **12** reagoval nukleosid **10** s (furyl-2-yl)SnBu<sub>3</sub> za účasti Pd-katalyzátoru, kterým byl v tomto případě Pd(OAc)<sub>2</sub>, a ligandu X-Phos v bezvodém DMF při teplotě 120 °C. Tento typ reakce je zvaný Stilleho cross-couplingová reakce (schéma 5) a její výtěžek v syntéze látky **12** činil 88 %.

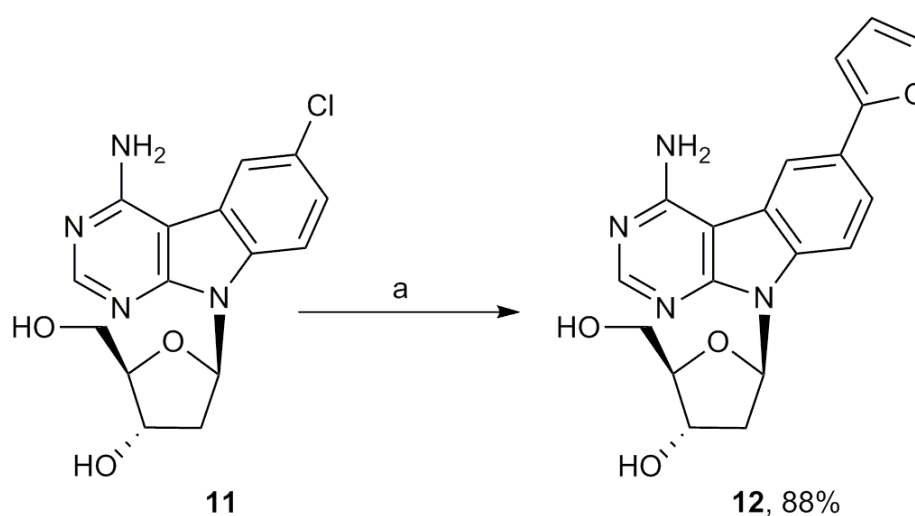


Schéma 5. Stilleho cross-couplingová reakce; **a**) Pd(OAc)<sub>2</sub>, X-Phos, (furan-2-yl)SnBu<sub>3</sub>, bezvodý DMF, 120 °C, 24 h.

Suzukiho cross-couplingovou reakcí byla syntetizována látka **13**. Jako katalyzátor byl opět použit Pd(OAc)<sub>2</sub> a ligand X-Phos, vedle toho byl do reakční směsi přidán K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, (benzofuran-2-yl)boronová kyselina, bezvodý DMF a nukleosid **11**. Reakce probíhala při teplotě 120 °C (schéma 6, str. 46). Produkt **13** byl získán s výtěžkem 94 %.

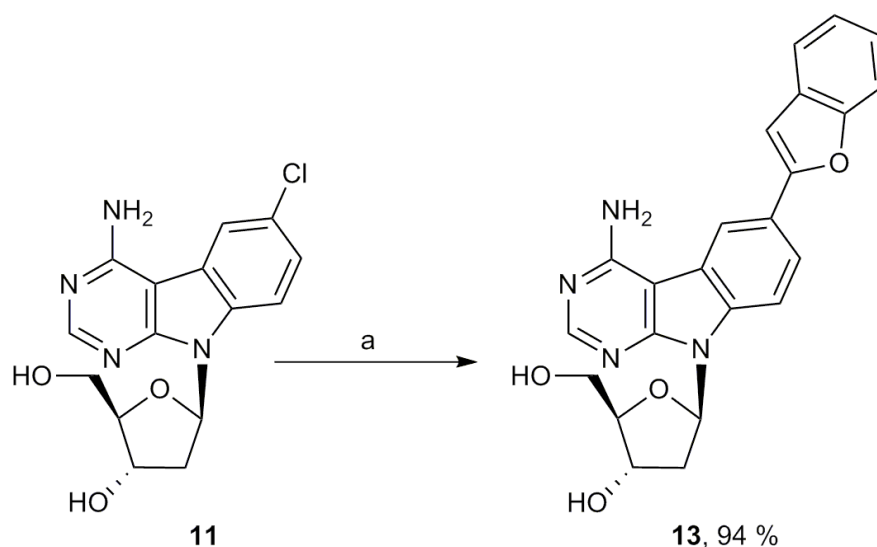


Schéma 6. Suzukiho cross-couplingová reakce; **b)** Pd(OAc)<sub>2</sub>, X-phos, (benzofuran-2-yl)B(OH)<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, bezvodý DMF, 120 °C, 24 h.

#### 4.1.5 Trifosforylace substituovaných pyrimido[4,5-*b*]indolových 2'-deoxyribonukleosidů

Finálním krokem syntézy vedoucí k zisku 2'-deoxyribonukleosid trifosfátu byla fosforylace nukleosidů **11**, **12** a **13**. Ve všech případech byla použita stejná metoda, kdy k výchozím látkám rozpuštěným v trimethylfosfátu byl nejprve přidán POCl<sub>3</sub> (1,2 eq) při teplotě 0 °C. Následně byl ke směsi přidán roztok (NHBu<sub>3</sub>)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (5 eq.) a tributylaminu (4,2 eq.) v bezvodém DMF. Reakce byla ukončena přidáním 2M vodného roztoku TEAB. Protože je hydroxylová skupina v pozici 5' na cukerné složce reaktivnější, probíhala substituce převážně do této polohy. Z výsledku NMR však byla patrná i přítomnost fosfátové skupiny v pozici 3'. Stejně tak byly ve spektru vidět i monofosfátové či difosfátové analogy, ty byly ze směsi odstraněny pomocí iontové výměnné chromatografie (DEAE Sephadex; 0-1,2M TEAB), resp. pomocí HPLC (5-100 % MeOH v 0,1M TEAB). Nakonec byly 2'-deoxyribonukleotidy **14** a **15** převedeny na Na<sup>+</sup> sůl. Převedení na sodnou sůl bylo provedeno na koloně obsahující DOWEX50WX8-100. Reakcí popsanou

schématem 7 byly získány látky **14** s výtěžkem 44 %, **15** s výtěžkem 39 % a **16** s výtěžkem 55 %.

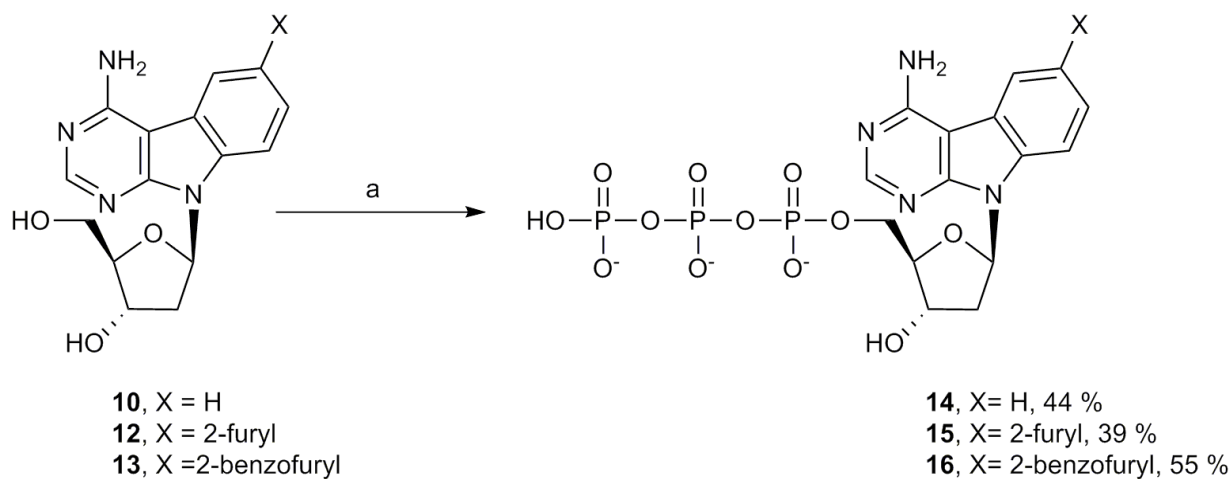


Schéma 7. Trifosforylace 2'-deoxyribonukleosidu; **a)** 1. POCl<sub>3</sub>, trimethylfosfát 0 °C, 2 h;  
 2. (NHBu<sub>3</sub>)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, Bu<sub>3</sub>N, DMF, 0 °C, 2 h; 3. 2M TEAB

## 4.2 Inkorporace modifikovaných 2'-deoxyribonukleotidů do DNA

Všechny tři syntetizované 2'-deoxyribonukleosid trifosfáty **14** (dA<sup>H</sup>TP), **15** (dA<sup>F</sup>TP), **16** (dA<sup>BF</sup>TP) a jeden obdržený **17** (dA<sup>Cl</sup>TP) [47] byly využity jako substrát pro DNA polymerasy při použití techniky PEX. Jako templáty byly použity temp<sup>OA</sup> a temp<sup>PB</sup> řetězce oligonukleotidů. Jejich sekvence jsou uvedeny v tabulce č. 5, ze které vyplývá, že temp<sup>OA</sup> teoreticky poskytuje produkt s právě jedním místem modifikace, temp<sup>PB</sup> pak poskytuje produkt s modifikacemi na čtyřech místech. Tato místa jsou od sebe relativně vzdálená, což poskytuje DNA polymerase lepší podmínky pro inkorporaci modifikovaných nukleotidů a právě proto byl vybrán tento templát. V tabulce je také uvedena sekvence primeru (prim), který na 5' konci nese fluorescenční značení v podobě fluoresceinu (FAM), pomocí něhož byly výsledky vizualizovány (viz níže). Dále jsou v tabulce uvedené také sekvence očekávaných produktů.

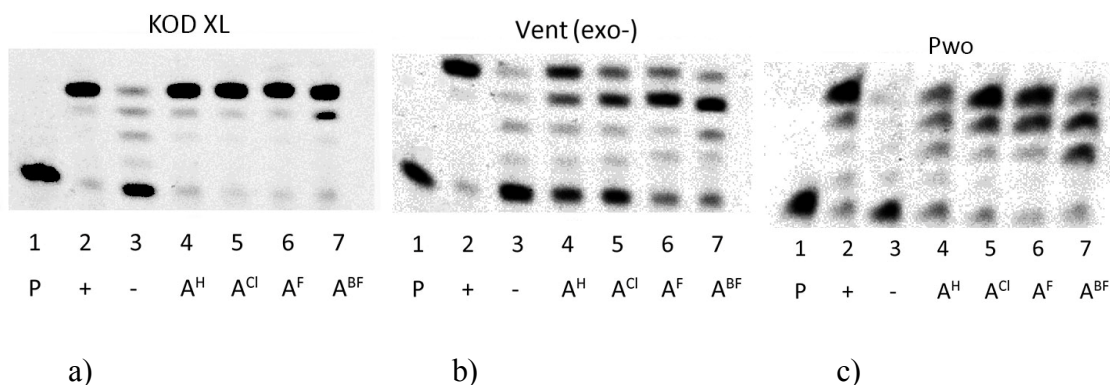
Tabulka č. 5 Sekvence primeru a templátů použitých pro PEX, tučně jsou označena místa modifikace, sekvence komplementárních primeru je podtržena

Primer Templát	Sekvence
primer	3'- GGGTACGGCGGGTAC-FAM- 5'
temp <sup>OA</sup>	5'- CCCT <u>CCCATGCCGCCCATG</u> - 3'
produkt	3'- GGGAGGGTACGGCGGGTAC- 5'
temp <sup>PB</sup>	5'- CTAGCATGAGCTCAGT <u>CCCATGCCGCCCATG</u> - 3'
produkt	3'-GATCGTACTCGAGTCAGGGTACGGCGGGTAC- 5'

Celkem byly použity tři DNA polymerasy pro inkorporaci modifikovaných analogů dATP do oligonukleotidového řetězce: KOD XL, Vent (exo-) a Pwo. Tyto enzymy byly použity na základě pozitivních zkušeností nejen z naší laboratoře (viz teoretický úvod). Při vizualizace výsledků PAGE bylo získáno vždy sedm drah. Dráha č. 1 obsahovala vždy primer, dráha č. 2 kontrolu pozitivní (k připravenému roztoku bylo přidáno dATP pro temp<sup>OA</sup> a směs dTTP, dCTP, dGTP pro temp<sup>PB</sup>) a dráha č. 3 kontrolu negativní (k připravenému roztoku byla přidána pouze voda). V dalších drahách byly obsaženy 2'-deoxyribonukleotidy. V dráze č. 4 byl dA\*TP nesoucí v pozici 6 vodík (dA<sup>H</sup>TP), v dráze č. 5 byl dA\*TP nesoucí v pozici 6 chlor (dA<sup>Cl</sup>TP), dráha č. 6 obsahovala dA\*TP s 2-furylem



pozici 6 (dA<sup>F</sup>TP) a dráha č. 7 obsahovala dA\*TP s 2-benzofurylem v pozici 6 (dA<sup>BF</sup>TP). Jednotlivé dA\*TP jsou seřazeny podle velikosti substituenty, kterým se vzájemně liší.



Obr. 9. Výsledky PAGE analýzi PEX reakce s temp<sup>OA</sup>

- a) enzym KOD XL, temp<sup>OA</sup>; v dráze 1 je primer (P), dráha 2 obsahuje kontrolu pozitivní (dATP, dGTP) a dráha 3 kontrolu negativní (dGTP). V dráze 4 je modifikovaný 2'-deoxyribonukleotid **16** (dA<sup>H</sup>TP, dGTP) v dráze 5 nukleotid **17** (dA<sup>Cl</sup>TP, dGTP), dráha 6 obsahuje nukleotid **14** (dA<sup>F</sup>TP, dGTP) a dráha 7 nukleotid **15** (dA<sup>BF</sup>TP, dGTP)
- b) enzym Vent (exo-), temp<sup>OA</sup>; v dráze 1 je primer 2 (P), dráha 2 obsahuje kontrolu pozitivní (dATP, dGTP), dráha 3 kontrolu negativní (dGTP). V dráze 4 je dA\*TP **16**, (dA<sup>H</sup>TP, dGTP) v dráze 5 je dA\*TP **17** (dA<sup>Cl</sup>TP, dGTP), dráha 6 obsahuje dA\*TP **14** (dA<sup>F</sup>TP, dGTP) a dráha 7 dA\*TP **15** (dA<sup>BF</sup>TP, dGTP)
- c) Vent (exo-), temp<sup>OA</sup>; v dráze 1 je primer (P), v dráze 2 kontrola pozitivní (dATP, dGTP) a v dráze 3 kontrola negativní (dGTP). V dráze 4 je obsažen dA\*TP **16** (dA<sup>H</sup>TP, dGTP), v dráze 5 dA\*TP **17** (dA<sup>Cl</sup>TP, dGTP). Dráha 6 obsahuje dA\*TP **15** (dA<sup>F</sup>TP, dGTP) a dráha 7 dA\*TP **15** (dA<sup>BF</sup>TP, dGTP).

Z výsledků vyplývá, že v případě použití KOD XL jako DNA polymerasy (obr. 9a, str. 49) byly všechny modifikované dATP úspěšně inkorporovány. Další elongace poskytla očekávané produkty, pouze v dráze 7 ( $A^{BF}$ ) je viditelný fragment, který značí neúplné dosyntetizování produktu, kdy KOD XL nezainkorporoval poslední dGTP do vzniklého řetězce. Podmínky experimentu jsou vedeny v tabulce č. 6 (str. 51).

Z obrázku 9b (str. 49) vyplývá, že Vent (exo-) DNA polymerasa měla problém zejména s elongací oligonukleotidového řetězce,  $dA^HTP$  (dráha 4) byl enzymem inkorporován za vzniku očekávaného produktu, avšak ve vzorku byl přítomen i primer, což může znamenat, že došlo k inhibici DNA polymerasy  $dA^HTP$ . Tato inhibice pak teoreticky mohla znemožnit enzymu začleňování dalších nukleotidů do ON.  $dA^{Cl}TP$  (dráha 5) byl DNA polymerasou inkorporován, avšak ve směsi byl přítomen i primer, což může znamenat, že i tento  $dA^*TP$  inhibuje Vent (exo-) DNA polymerasu, narozdíl od dráhy 4 je však vidět výraznější spot, kdy DNA polymerasa nezačlenila poslední dGTP do řetězce, a tak lze předpokládat, že většina produktu je ochuzena o tento poslední dNTP,  $dA^FTP$  (dráha 6) byl inkorporován tímto enzymem nejúspěšněji, avšak opět je patrný problém DNA polymerasy s elongací a dosyntetizováním posledního dGTP do řetězce.  $dA^{BF}TP$  (dráha 7) byl také enzymem inkorporován, ale opět nedošlo k úplnému prodloužení řetězce, z obrázku je také patrné, že enzym měl problém s pokračováním syntézy řetězce po inkorporaci modifikovaného nukleotidu, to lze vysvětlit velkým objemem substituentu v pozici 6, který brání DNA polymerase v její činnosti. Podmínky experimentu jsou uvedeny v tabulce č. 6 (str. 51).

Inkorporace  $dA^*TP$  enzymem Pwo (obr. 9c, str. 49) proběhla úspěšně, avšak problém byl s následnou elongací, což je patrné zejména z dráhy 4 ( $A^H$ ) a 7 ( $A^{BF}$ ), kdy DNA polymerasa nebyla schopná zcela dokončit syntézu nového ON. Vhodnější substráty pro enzym představují  $dA^{Cl}TP$  (dráha 6) a  $dA^FTP$  (dráha 7).

Tabulka č. 6 Složení reakční směsi<sup>a)</sup> pro PEX s použitím temp<sup>OA</sup>

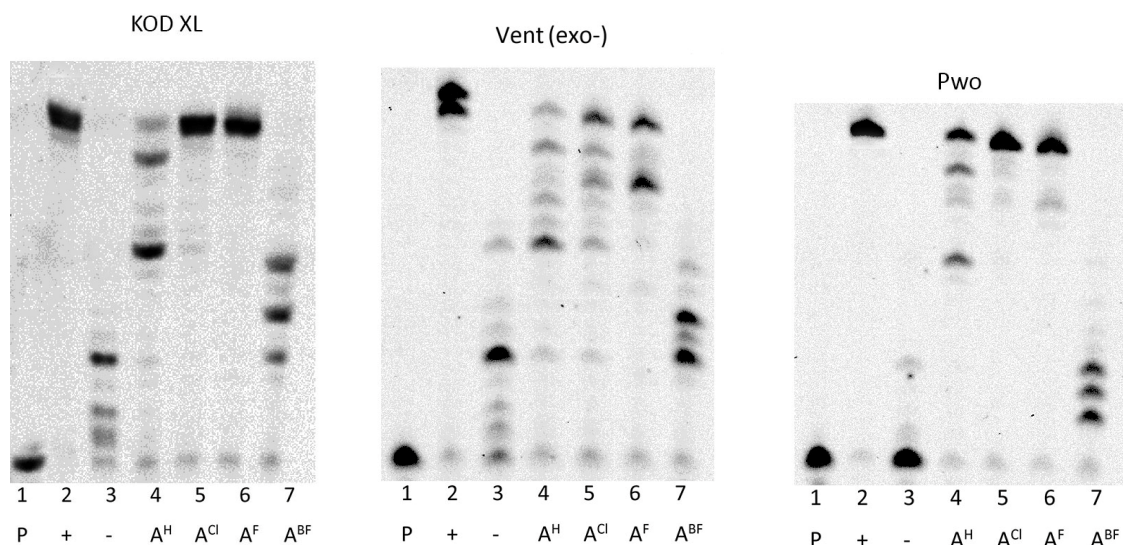
	KOD XL	Pwo	Vent (exo-)
Enzym	0,0625 U	0,2 U	0,1 U
dGTP	15μM	60μM	15μM
dA*TP	30μM	200μM	120μM
Doba trvání	15 min	20 min	30 min

<sup>a)</sup>Mimo výše uvedené rozdíly, obsahovala reakční směs (20 μl) primer (0,150μM), tempát (0,225μM) a reakční pufr specifický pro každou DNA polymerasu.

Tabulka č. 7 Složení reakční směsi<sup>a)</sup> pro PEX s použitím temp<sup>PB</sup>

	KOD XL	Pwo	Vent (exo-)
Enzym	0,0625 U	0,4 U	0,1 U
dGTP, dTTP, dCTP	30μM	100μM	60μM
dA*TP	1200μM	200μM	200μM
Doba trvání	30 min	20 min	30 min

<sup>a)</sup>Mimo výše uvedené rozdíly, obsahovala reakční směs (20 μl) primer (0,150μM), tempát(0,225μM) a reakční pufr specifický pro každou DNA polymerasu.



a)

c)

c)

Obr. 10. Výsledky PAGE analýzi PEX reakce s  $\text{temp}^{\text{PB}}$

a) enzym KOD XL,  $\text{temp}^{\text{PB}}$ ; v dráze 1 je primer (P), dráha 2 obsahuje kontrolu pozitivní (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) a dráha 3 kontrolu negativní (dGTP, dCTP, dTTP). V dráze 4 je modifikovaný 2-deoxyribonukleotid **16** (dA<sup>H</sup>TP, dGTP, dCTP, dTTP), v dráze 5 dN\*TP **17** (dA<sup>Cl</sup>TP, dGTP, dCTP, dTTP), dráha 6 obsahuje dN\*TP **14** (dA<sup>F</sup>TP, dGTP, dCTP, dTTP) dráha 7 dN\*TP **15** (dA<sup>BF</sup>TP, dGTP, dCTP, dTTP)

b) enzym Vent (exo-),  $\text{temp}^{\text{PB}}$ ; v dráze 1 je primer 2 (P), dráha 2 obsahuje kontrolu pozitivní (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), dráha 3 kontrolu negativní (dGTP, dCTP, dTTP). V dráze 4 je dA\*TP **16** (dA<sup>H</sup>TP, dGTP, dCTP, dTTP), v dráze 5 je dA\*TP **17** (dA<sup>Cl</sup>TP, dGTP, dCTP, dTTP), dráha 6 obsahuje dA\*TP **14** (dA<sup>F</sup>TP, dGTP, dCTP, dTTP) a dráha 7 dA\*TP **15** (dA<sup>BF</sup>TP, dGTP, dCTP, dTTP)

c) Vent (exo-),  $\text{temp}^{\text{PB}}$ ; v dráze 1 je primer (P), v dráze 2 kontrola pozitivní (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) a v dráze 3 kontrola negativní (dGTP, dCTP, dTTP). V dráze 4 je obsažen dA\*TP **16** (dA<sup>H</sup>TP, dGTP, dCTP, dTTP), v dráze 5 dA\*TP **17** (dA<sup>Cl</sup>TP, dGTP, dCTP, dTTP). Dráha 6 obsahuje dA\*TP **14** (dA<sup>F</sup>TP, dGTP, dCTP, dTTP) a dráha 7 dA\*TP **15** (dA<sup>BF</sup>TP)

Z výsledků při použití KOD XL jako DNA polymerasy (obr. 10a, str. 52) je patrné, že k úplnému dosyntetizování komplementárního řetězce došlo v drahách 6 a 7, tedy **dA<sup>Cl</sup>TP** a **dA<sup>F</sup>TP** byly DNA polymerasou inkorporovány tak, že získaný produkt obsahoval ve své struktuře 4 modifikace. **dA<sup>H</sup>TP** (dráha 4) byl enzymem také inkorporován, nicméně viditelné fragmenty ukazují, že DNA polymerasa měla problém inkorporovat modifikovaný substrát tak, aby došlo k úplnému dosyntetizování komplementárního řetězce. Za nejméně vhodný substrát lze považovat **dA<sup>BF</sup>TP** (dráha 7), v tomto případě nebyla schopná DNA polymerasa vytvořit vlákno o délce odpovídající délce templátu. Podmínky experimentu jsou uvedeny v tabulce č. 7 (str. 51).

Nejméně vhodnou DNA polymerasou pro syntézu modifikovaného ON podle temp<sup>PB</sup> byl Vent (exo-) (obr. 10b, str. 52). I přestože enzym dokázal částečně zainkorporovat všechny modifikované dA\*TP, elongace probíhala velmi obtížně, což je patrné zejména z dráhy 4 (**A<sup>H</sup>**) a také 7 (**A<sup>BF</sup>**), kde nedošlo k vytvoření produktu o odpovídající délce. Syntéza komplementárního řetězce s **dA<sup>Cl</sup>TP** a **dA<sup>F</sup>TP** (dráha 5 a 6) proběhla úspěšněji, i přestože přítomnost mnoha fragmentů opět značí problém DNA polymerasy s úplnou elongací. Podmínky experimentu jsou uvedeny v tabulce č. 7 (str. 51).

V případě použití Pwo DNA polymerasy (obr. 10c, str. 52) lze říci, že ani v tomto případě není **dA<sup>BF</sup>TP** (dráha 7) vhodný substrát pro DNA polymerasu, naopak za dobrý substrát lze považovat **dA<sup>Cl</sup>TP** a **dA<sup>F</sup>TP**, (dráha 5 a 6), kdy v obou případech došlo k vytvoření produktu o délce odpovídající templátu, **A<sup>H</sup>** (dráha 4) byl enzymem také inkorporován, avšak z fragmentů je patrné, že DNA polymerasa měla problém s elongací. Podmínky experimentu jsou uvedeny v tabulce č. 7 (str. 51).

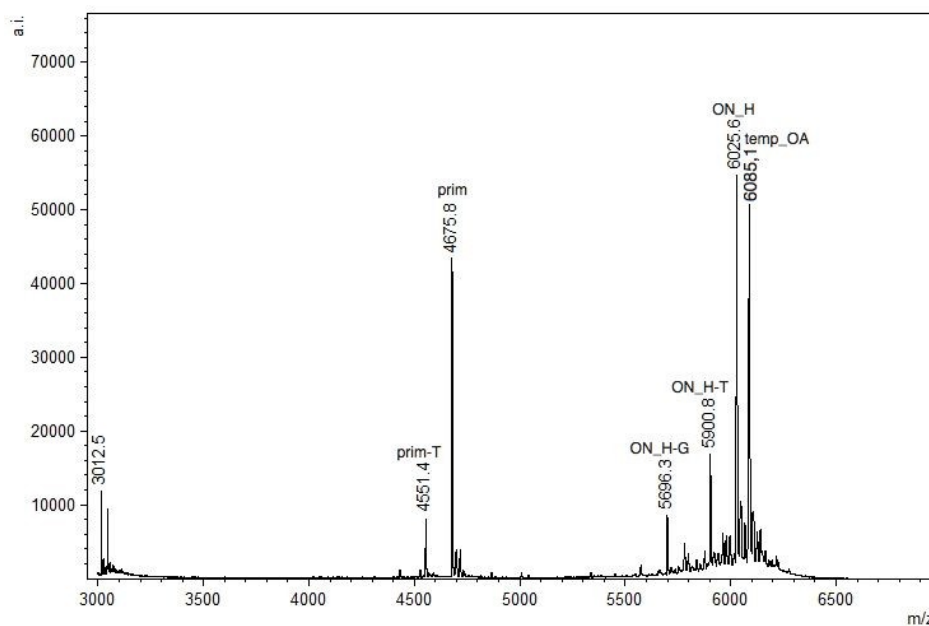
Abychom potvrdili výsledky získané pomocí PAGE, rozhodli jsme se změřit hmotnostní spektra oligonukleotidových produktů po PEX reakci s temp<sup>OA</sup> a temp<sup>PB</sup> pomocí MALDI-TOF analýzy. Protože z výsledků PAGE analýzy vychází jako nejvhodnější DNA polymerasa KOD XL, byl použit právě tento enzym. Příprava roztoků pro PEX a následnou analýzu MALDI-TOF je uvedena níže. Během hmotnostní spektrometrie dochází k ionizaci molekul, což může mít za následek odpojení thyminu z oligonukleotidového řetězce. Hodnoty pro takové produkty jsou značeny ve spektru (-T), ale dále nebudou diskutovány. Molekulové hmotnosti očekávané a experimentálně získané jsou uvedeny v tabulce č. 8 a 9 (str. 54 a 58).

Reakční směs (50 µl) pro PEX reakci obsahovala primer (4µM), templát (5'-bio) (4µM), KOD XL DNA polymerasu (0,750 U), dNTP (300µM), dA\*TP (300µM) a reakční pufr pro KOD XL.

Nejprve byla provedena MALDI-TOF analýza produktů po PEX reakci pro temp<sup>OA</sup>.

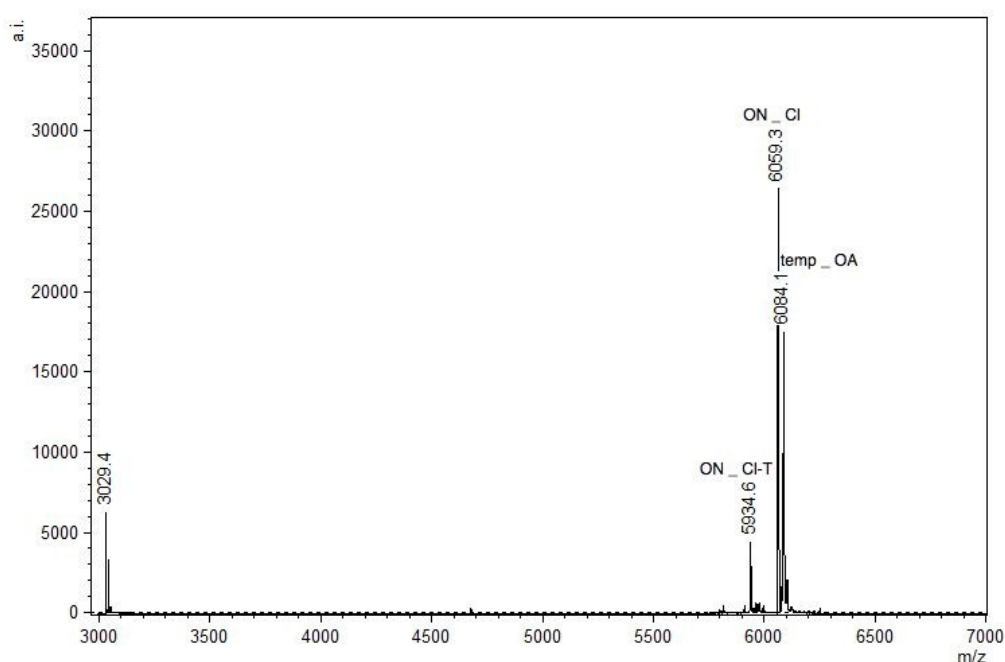
Tabulka č. 8 Molekulové hmotnosti pro MALDI-TOF analýzu s temp<sup>OA</sup>

	Očekávaná hmotnost	Získaná hmotnost
(5'-bio) temp <sup>OA</sup>	6083,0 Da	6083,1 – 6084,1 Da
primer	4674,0 Da	4674,4 - 4674,8 Da
OA <sup>H</sup>	6024,0 Da	6024,6 Da
OA <sup>Cl</sup>	6057,9 Da	6058,3 Da
OA <sup>F</sup>	6090,0 Da	6090,4 Da
OA <sup>BF</sup>	6140,0 Da	6139,9 Da



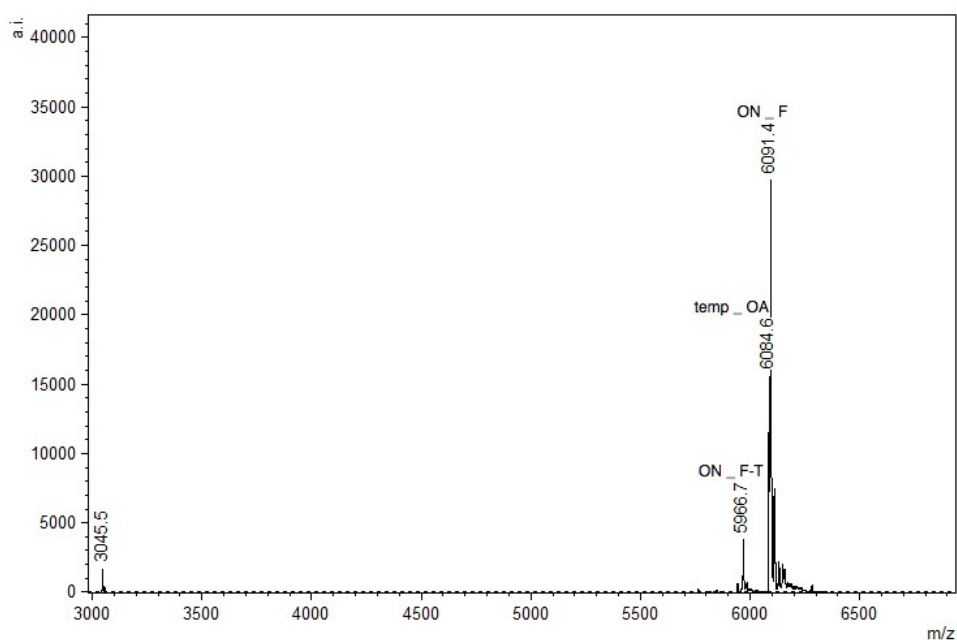
Obr. 11. Hmotnostní spektrum pro KOD XL, temp<sup>OA</sup>, A<sup>H</sup>; ve spektru byl nalezen vrchol odpovídající templátu (temp\_OA), primeru (prim) a primeru zkrácenému o thymin (prim-T), dále byla nalezena hmotnost odpovídající produktu (ON\_H), produktu zkrácenému o 1 guaninový nukleotid (ON\_H-G) a hmotnost produktu zkráceného o thymin (ON\_H-T).

Z výsledků hmotnostních spekter pro  $\mathbf{A}^H$  (obr. 11, str. 54) je patrné, že ve vzorku byl mimo produktu  $\mathbf{ON}^H$  přítomen také primer (prim) a templát ( $\text{temp}^{OA}$ ), což může být zapříčiněno vysokou teplotou při denaturaci (55 °C), i přestože se tato teplota standardně používá, lze uvažovat možnost, že se biotinylovaný templát odpojil z magnetické kuličky, a proto je jeho vrchol obsažen ve spektru. Zároveň je biotinylované vlákno snadněji ionizovatelné, proto zdánlivě velký pík nemusí znamenat vysokou koncentraci této látky ve vzorku. Ve spektru je viditelný také vrchol, který svoji hmotností odpovídá produktu zkrácenému o guaninový nukleotid  $\mathbf{ON}^H\text{-G}$ .



Obr. 12. Hmotnostní spektrum pro KOD XL,  $\text{temp}^{OA}$ ,  $\mathbf{A}^{Cl}$ ; v tomto spektru byl nalezen vrchol odpovídající ( $\text{temp}_{OA}$ ), pík odpovídající svojí hmotností produktu ( $\text{ON}_{Cl}$ ) a produktu zkrácenému o thymín ( $\text{ON}_{Cl}\text{-T}$ ).

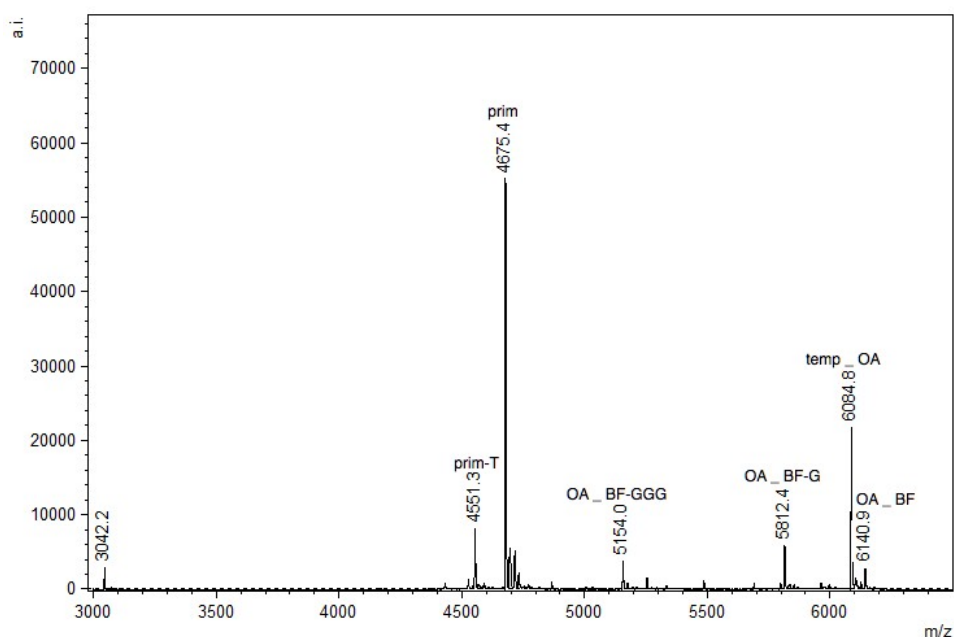
V hmotnostním spektru pro  $\mathbf{A}^{Cl}$  (obr. 12) nebyly přítomny fragmenty, které by odpovídaly primeru či nedosyntetizovanému produktu. Ve vzorku byl ale nalezen produkt  $\mathbf{ON}^{Cl}$  a templát ( $\text{temp}^{OA}$ ), proto lze při těchto podmínkách  $\mathbf{A}^{Cl}$  za vhodný substrát pro KOD XL polymerasu.



Obr. 13. Hmotnostní spektrum pro KOD XL,  $\text{temp}^{\text{OA}}$ ,  $\mathbf{A}^{\text{F}}$ ; v tomto spektru byl kromě píku templátu ( $\text{temp\_OA}$ ) obsažen také pík odpovídající svojí hmotností produktu ( $\text{ON\_F}$ ) a produktu zkrácenému o thymín ( $\text{ON\_F-T}$ ).

V hmotnostním spektru pro  $\mathbf{A}^{\text{F}}$  (obr. 13), obdobně jako na obr. 12, nebyly ve vzorku nalezeny fragmenty nedosyntetizovaného vlákna. Přítomen byl ale produkt  $\mathbf{ON}^{\text{F}}$  a templát ( $\text{temp}^{\text{OA}}$ ), a proto i  $\mathbf{A}^{\text{F}}$  lze považovat za vhodný substrát pro KOD XL DNA polymerasu.





Obr. 14. Hmotnostní spektrum pro KOD XL, temp<sup>OA</sup>, **A<sup>BF</sup>**; v tomto vzorku byla kromě templátu (temp\_OA) a primeru (prim) nalezena celá řada fragmentů. Fragment odpovídající produktu zkrácenému o guaninový nukleotid (OA\_BF-G), fragment odpovídající produktu zkrácenému o 3 guaninové nukleotidy (OA\_BF-GGG) a samotný produkt (OA\_BF). Nalezen byl také primer zkrácený o thymin (prim-T).

V hmotnostním spektru pro **A<sup>BF</sup>** (obr. 14) byla kromě produktu **ON<sup>BF</sup>**, templátu (temp<sup>OA</sup>) a primeru (prim) obsažena také nedosyntetizovaná vlákna. **ON<sup>BF</sup>-G** odpovídá očekávanému produktu, jenž je zkrácen právě o jeden guaninový nukleotid, **ON<sup>BF</sup>-GGG** pak představuje molekulární hmotnost primeru prodloženého o **A<sup>BF</sup>**, což znamená, že po inkorporaci **A<sup>BF</sup>** probíhala další elongace jen velmi omezeně. Malý pík produktu **ON<sup>BF</sup>** může indikovat nízkou koncentraci produktu ve vzorku, zároveň to může být také důsledek nízké ionizace oligonukleotidového řetězce, který ve své struktuře nese aromatickou molekulu.

Analýza hmotnostních spekter pomocí metody MALDI-TOF byla provedena také pro produkty po PEX reakci s temp<sup>PB</sup>. Hmotnosti očekávaných produktů jsou uvedeny v tabulce č. 9. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 10.

Tabulka č. 9 Molekulové hmotnosti pro MALDI-TOF analýzu s temp<sup>PB</sup>

	Očekávaná hmotnost	Získaná hmotnost
(5'-bio) temp <sup>PB</sup>	9851,8 Da	9851,8 - 9853Da
primer	4674,0 Da	4674,4 - 4674,8 Da
PB <sup>H</sup>	9813,7 Da	produkt nenalezen
PB <sup>Cl</sup>	9949,3 Da	produkt nenalezen
PB <sup>F</sup>	10077,7 Da	produkt nenalezen
PB <sup>BF</sup>	10277,7 Da	produkt nenalezen

Tabulka č. 10 Výsledky MALDI-TOF analýzi po PEX reakci s temp<sup>PB</sup>

Substrát:	Nalezená hmotnost [Da]:	Odpovídající sekvence:
A <sup>H</sup> (nukleotid 16)	4674,9	primer
	5960,1	primer+A <sup>H</sup> CTG
	9853,0	temp <sup>PB</sup>
A <sup>Cl</sup> (nukleotid 17)	4674,0	primer
	5993,6	primer+A <sup>Cl</sup> CTG
	7602,9	primer+A <sup>Cl</sup> CTGA <sup>Cl</sup> GCTC
	9851,9	temp <sup>PB</sup>
A <sup>F</sup> (nukleotid 14)	4674,2	primer
	5102,7	primer+A <sup>F</sup>
	5696,1	primer+A <sup>F</sup> CT
	6025,4	primer+A <sup>F</sup> CTG
	9851,8	temp <sup>PB</sup>
A <sup>BF</sup> (nukleotid 15)	4674,2	primer
	5153,7	primer+A <sup>BF</sup>
	9851,8	temp <sup>PB</sup>

Z tabulky vyplývá, že při použití templátu temp<sup>PB</sup> nebyla KOD XL DNA polymerasa schopná inkorporovat modifikované nukleotidy tak, aby došlo ke vzniku očekávaného produktu. Pro další účely budou nalezeny podmínky pro PEX reakci, při kterých dochází nejen k inkorporaci dA\*TP DNA polymerasou, ale také k elongaci oligonukleotidového řetězce až zisku očekávaného produktu.

## 5. Závěr

Byla připravena série nových 2'-deoxyribonukleosid trifosfátů odvozených od pyrimido[4,5-*b*]indolu. Jejich syntéza vycházela z přípravy cukerného bloku a nukleobáze, které byly spojeny glykosylační reakcí. Odchráněné 2'-deoxyribonukleosidy byly dále použity ke cross-couplingové reakci, při níž byla zavedena do pozice 6 hetarylová skupina. Finální krok syntézy představovala trifosforylace vhodně substituovaných 2'-deoxyribonukleosidů. Tímto způsobem byly syntetizovány celkem tři analogy dATP.

Čtyři modifikované 2'-deoxyribonukleosid trifosfáty byly poté inkorporovány metodou PEX do oligonukleotidového řetězce. Jako templát byl využit temp<sup>OA</sup>, jehož produkt obsahoval teoreticky právě jedno modifikované místo, a templát temp<sup>PB</sup>, jehož produkt poskytoval modifikovaná místa čtyři. Byly použity celkem tři DNA polymerasy, které inkorporovaly jednotlivé dA\*TP s různou úspěšností.

PEX reakce s KOD XL (směs KOD a KOD<sup>(exo-)</sup>) jako DNA polymerasou a temp<sup>OA</sup> jako templátem vedla k úspěšné inkorporaci dA\*TP a následnému dosyntetizování ON až k očekávaným produktům. PEX reakce s Pwo DNA polymerasou a temp<sup>OA</sup> vedla k zisku mnoha fragmentů, které neodpovídaly očekávanému produktu. I přestože k inkorporaci dA\*TP došlo ve všech případech, následná elongace činila této DNA polymerase problém a to zejména u **A<sup>BF</sup>** (dA\*TP s benzofurylem v pozici 6) a **A<sup>H</sup>** (dA\*TP s vodíkem v pozici 6). **A<sup>Cl</sup>** (dA\*TP s chlorem v pozici 6) **A<sup>F</sup>** (dA\*TP s furylem v pozici 6) představovaly vhodnější substráty pro Pwo DNA polymerasu. Jako poslední byl použit enzym Vent (exo-), který nemá exonukleasovou aktivitu, a proto práce s ním byla narozdíl od enzymu Pwo snadnější. Tato DNA polymerasa také inkorporovala všechny čtyři dA\*TP, avšak další elongace představovala problém. Nejméně vhodným substrátem byl, stejně jako pro Pwo, **A<sup>BF</sup>**. Naopak k dosyntetizování ON a zisku očekávaného produktu došlo po inkorporaci **A<sup>H</sup>**.

Při použití temp<sup>PB</sup> jako templátu při PEX reakci byly získány velmi podobné výsledky pro všechny DNA polymerasy. Nejméně vhodným substrátem pro tyto enzymy byl **A<sup>BF</sup>**, lze předpokládat, že velikost substituenty vedla k omezení činnosti DNA polymeráz. Stejně tak **A<sup>H</sup>** působil enzymům značné problémy. Naopak vhodnými substráty byly **A<sup>Cl</sup>** a **A<sup>F</sup>** a to zejména pro KOD XL a Pwo DNA polymerasy.

Jelikož anelovaný benzenový kruh je k nukleobázi připojen nejen v pozici 7, která představuje vhodné místo pro modifikace (viz teoretický úvod), ale také v pozici 8, ve které mohou nevhodné substituenty vést k vynucené *syn*-konformaci cukerné složky vůči nukleobázi, lze získané výsledky považovat za velmi dobré.

Analogy dATP, kterým se věnuje tato bakalářská práce (nukleotidy **14**, **15**, **16** a **17**) mohou být využity při zkoumání SNP, tedy k rozeznání mutací. Dále lze tyto modifikované nukleotidy použít pro UV, resp. fluorescenční spektrometrii.

## Citace

- [1] J. D. Watson a F. Crick, „Molecular structure of nucleic acids", *Nature*, roč. 171, s. 737–738, 1953.
- [2] B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, K. Roberts, a P. Walter, *Základy buněčné biologie*, 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing, s.r.o., 1998.
- [3] R. E. Dickerson, H. R. Drew, B. N. Conner, R. M. Wing, A. V. Fratini, a M. L. Kopka, „The Anatomy of A-, B- and Z-DNA", *Science*, roč. 216, s. 475–485, 1982.
- [4] D. Voet a J. G. Voet, *Biochemistry*, 3. vyd. New Jersey: Wiley and Sons, INC, 2004.
- [5] Obrázek převat od kolegyně J. Balintové a následně upraven.
- [6] J. Balintová, „Syntéza vybraných funkcionalizovaných nukleosidů a nukleosid trifosfátů a jejich inkorporace do DNA", Dizertační práce, Univerzita Karlova v Praze, 2014.
- [7] M. Hocek, „Příprava DNA s modifikovanými bázemi enzymatickou inkorporací modifikovaných nukleosid-trifosfátů", *Chem. List.*, roč. 325, s. 320–325, 2014.
- [8] Obrázek převzat od kolegyně J. Dadové a následně upraven.
- [9] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, a H. Erlich, „Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction.", *Cold Spring Harb. Symp.*, roč. 51, s. 263–273, 1986.
- [10] K. Baumforth, J. E. Digby, J. D. O'neil, P. D. Murray a P. Nelson, „The polymerase chain reaction.", *Mol. Pathol.*, roč. 52, s. 1–10, 1999.
- [11] I. Sonoko a I. Yoshizumi, „DNA polymerases as useful reagents for biotechnology- the histroy of developmental research in the field", *Front. Microbiol.*, roč. 5, s. 1–8, 2014.

- [12] M. Bessman, A. Kornberg, I. Lehman, a E. Simms, „Enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid", *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, roč. 1, s. 197–198, 1956.
- [13] K. Terpe, „Overview of thermostable DNA polymerases for classic PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, roč. 97, s. 10243–10254, 2013.
- [14] A. Chien, D. B. Edgar, a J. M. Trela, „Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*", *J. Bacteriol.*, roč. 127, s. 1550–1557, 1976.
- [15] H. Atomi, T. Fukui, T. Kanai, M. Morikawa, a T. Imanaka, „Description of *Thermococcus kodakaraensis* sp. nov., a well studied hyperthermophilic archaeon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1", *Archaea*, roč. 1, s. 263–267, 2004.
- [16] M. Nishioka, H. Mizuguchi, S. Fujiwara, S. Komatsubara, M. Kitabayashi, H. Uemura, M. Takagi, a T. Imanaka, „Long and accurate PCR with a mixture of KOD DNA polymerase and its exonuclease deficient mutant enzyme", *J. Biotechnol.*, roč. 88, s. 141–149, 2001.
- [17] M. M. Masud, a Ozaki-Nakamura, F. Satou, T. Ohbayashi, H. Ozaki, a H. Sawai, „Enzymatic synthesis of modified DNA by PCR.", *Nucleic Acids Res.*, roč. 1, s. 21–22, 2001.
- [18] A. Neuner, H. Jannasch, S. Belkin, a K. Stetter, „*Thermococcus litoralis* sp. nov.: A new species of extremely thermophilic marine archaeobacteria", *Arch. Microbiol.*, roč. 153, s. 205–207, 1990.
- [19] P. Mattila, J. Korpela, T. Tenkanen, a K. Pitkänen, „Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase- an extremely heat stable enzyme with proofreading activity.", *Nucleic Acids Res.*, roč. 19, s. 4967–4973, 1991.

- [20] S. Dabrowski a J. Kur, „Cloning and expression in *Escherichia coli* of the recombinant his-tagged DNA polymerases from *Pyrococcus furiosus* and *Pyrococcus woesei*.", *Protein Expr. Purif.*, roč. 14, s. 131–138, 1998.
- [21] M. Hollenstein, „Nucleoside Triphosphates - Building Blocks for the Modification of Nucleic Acids", *Molecules*, roč. 17, s. 13569–13591, 2012.
- [22] M. Hollenstein, „Synthesis of deoxynucleoside triphosphates that include proline, urea, or sulfonamide groups and their polymerase incorporation into DNA", *Chem.-Eur. J.*, roč. 18, s. 13320–13330, 2012.
- [23] M. Hocek, „Synthesis of Base-Modified 2'-Deoxyribonucleoside Triphosphates and Their Use in Enzymatic Synthesis of Modified DNA for Applications in Bioanalysis and Chemical Biology", *J. Org. Chem.*, roč. 79, s. 9914–9921, 2014.
- [24] V. Raindlová, „Construction of novel types of nucleotides and nucleic acids bearing functional groups", Dizertační práce, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2013.
- [25] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, a P. Wothers, *Organic Chemistry*, 2. vyd. Oxford University Press, 2001.
- [26] J. Riedl, R. Pohl, N. P. Ernsting, P. Orság, M. Fojta, a M. Hocek, „Labelling of nucleosides and oligonucleotides by solvatochromic 4-aminophthalimide fluorophore for studying DNA–protein interactions", *Chem. Sci.*, roč. 3, s. 2797, 2012.
- [27] J. Riedl, P. Ménová, R. Pohl, P. Orság, M. Fojta, a M. Hocek, „GFP-like fluorophores as DNA labels for studying DNA-protein interactions", *J. Org. Chem.*, roč. 77, s. 8287–8293, 2012.
- [28] J. Riedl, „Syntéza redoxně a fluorescenčně značených DNA pomocí enzymatické inkorporace modifikovaných nukleosid trifosfátů", Dizertační práce, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2012.



- [29] A. Okamoto, K. Tanaka, T. Fukuta, a I. Saito, „Design of base-discriminating fluorescent nucleoside and its application to T/C SNP typing", *J. Am. Chem. Soc.*, roč. 125, s. 9296–9297, 2003.
- [30] P. Brázdilová, M. Vrábel, R. Pohl, H. Pivoňková, L. Havran, M. Hocek, a M. Fojta, „Ferrocenylethynyl derivatives of nucleoside triphosphates: Synthesis, incorporation, electrochemistry, and bioanalytical applications", *Chem.-Eur. J.*, roč. 13, s. 9527–9533, 2007.
- [31] H. Cahová, L. Havran, P. Brázdilová, H. Pivoňková, R. Pohl, M. Fojta, a M. Hocek, „Aminophenyl- and nitrophenyl-labeled nucleoside triphosphates: Synthesis, enzymatic incorporation, and electrochemical detection", *Angew. Chem. Int. Edit.*, roč. 47, s. 2059–2062, 2008.
- [32] P. Čapek, H. Cahová, R. Pohl, M. Hocek, C. Gloeckner, a A. Marx, „An efficient method for the construction of functionalized dna bearing amino acid groups through cross-coupling reactions of nucleoside triphosphates followed by primer extension or PCR", *Chem.-Eur. J.*, roč. 13, s. 6196–6203, 2007.
- [33] S. Ikonen, H. Macíčková-Cahová, R. Pohl, M. Šanda, a M. Hocek, „Synthesis of nucleoside and nucleotide conjugates of bile acids, and polymerase construction of bile acid-functionalized DNA.", *Org. Biomol. Chem.*, roč. 8, s. 1194–1201, 2010.
- [34] P. Kielkowski, R. Pohl, a M. Hocek, „Synthesis of acetylene linked double-nucleobase nucleos(t)ide building blocks and polymerase construction of DNA containing cytosines in the major groove", *J. Org. Chem.*, roč. 76, s. 3457–3462, 2011.
- [35] J. Dadová, P. Orság, R. Pohl, M. Brázdová, M. Fojta, a M. Hocek, „Vinylsulfonamide and acrylamide modification of DNA for cross-linking with proteins", *Angew. Chem. Int. Edit.*, roč. 52, s. 10515–10518, 2013.
- [36] C. T. Wirges, J. Timper, M. Fischler, A. S. Sologubenko, J. Mayer, U. Simon, a T. Carell, „Controlled nucleation of DNA metallization", *Angew. Chem. Int. Edit.*, roč. 48, s. 219–223, 2009.

- [37] V. Borsenberger a S. Howorka, „Diene-modified nucleotides for the Diels-Alder-mediated functional tagging of DNA", *Nucleic Acids Res.*, roč. 37, s. 1477–1485, 2009.
- [38] V. Raindlová, R. Pohl, M. Šanda, a M. Hocek, „Direct polymerase synthesis of reactive aldehyde-functionalized DNA and Its conjugation and staining with hydrazines", *Angew. Chem. Int. Edit.*, roč. 49, s. 1064–1066, 2010.
- [39] P. Kielkowski, H. Macíčková-Cahová, R. Pohl, a M. Hocek, „Transient and Switchable (Triethylsilyl)ethynyl Protection of DNA againts Cleavage by Restriction Endonucleases", *Angew. Chem. Int. Edit.*, roč. 50, s. 8727–8730, 2011.
- [40] P. Nauš, R. Pohl, I. Votruba, P. Džubák, M. Hajdúch, R. Ameral, G. Birkuš, T. Wang, A. S. Ray, R. Mackman, T. Cihlar, a M. Hocek, „6-(Het)aryl-7-deazapurine ribonucleosides as novel potent cytostatic agents", *J. Med. Chem.*, roč. 53, s. 460–470, 2010.
- [41] A. Bourderieux, P. Nauš, P. Perlíková, R. Pohl, I. Pichová, I. Votruba, P. Džubák, P. Konečný, M. Hajdúch, K. M. Stray, T. Wang, A. S. Ray, J. Y. Feng, G. Birkus, T. Cihlar, a M. Hocek, „Synthesis and significant cytostatic activity of 7-hetaryl-7-deazaadenosines", *J. Med. Chem.*, roč. 54, s. 5498–5507, 2011.
- [42] M. Tichý, R. Pohl, E. Tloušťová, J. Weber, G. Bahador, Y. J. Lee, a M. Hocek, „Synthesis and biological activity of benzo-fused 7-deazaadenosine analogues. 5- and 6-substituted 4-amino- or 4-alkylpyrimido[4,5-b]indole ribonucleosides", *Bioorg. Med. Chem.*, roč. 21, s. 5362–5372, 2013.
- [43] M. Tichý, R. Pohl, H. Y. Xu, Y. L. Chen, F. Yokokawa, P. Y. Shi, a M. Hocek, „Synthesis and antiviral activity of 4,6-disubstituted pyrimido[4,5-b]indole ribonucleosides", *Bioorg. Med. Chem.*, roč. 20, s. 6123–6133, 2012.
- [44] M. Quintiliani, J. Balzarini, a C. McGuigan, „Design, synthesis, and biological evaluation of C1-phosphoramidate analogues of 2-deoxy-d-ribose-1-phosphate", *Tetrahedron*, roč. 69, s. 9111–9119, 2013.

- [45] I. Dhimitruka a J. SantaLucia Jr., „Efficient Preparation of 2-Deoxy-3,5-di-O-p-toluoyl- $\alpha$ -D-ribofuranosyl chloride", *Synlett*, roč. 15, s. 335–337, 2004.
- [46] J. Kawakami, Z.-M. Wang, H. Fujiki, S. Izumi, a N. Sugimoto, „Introduciton of Peptide Functions into DNA by Nucleic Acid", *Chem. Lett.*, roč. 33, s. 1554–1555, 2005.
- [47] Tichý Michal, „Nepublikované výsledky."

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámky